

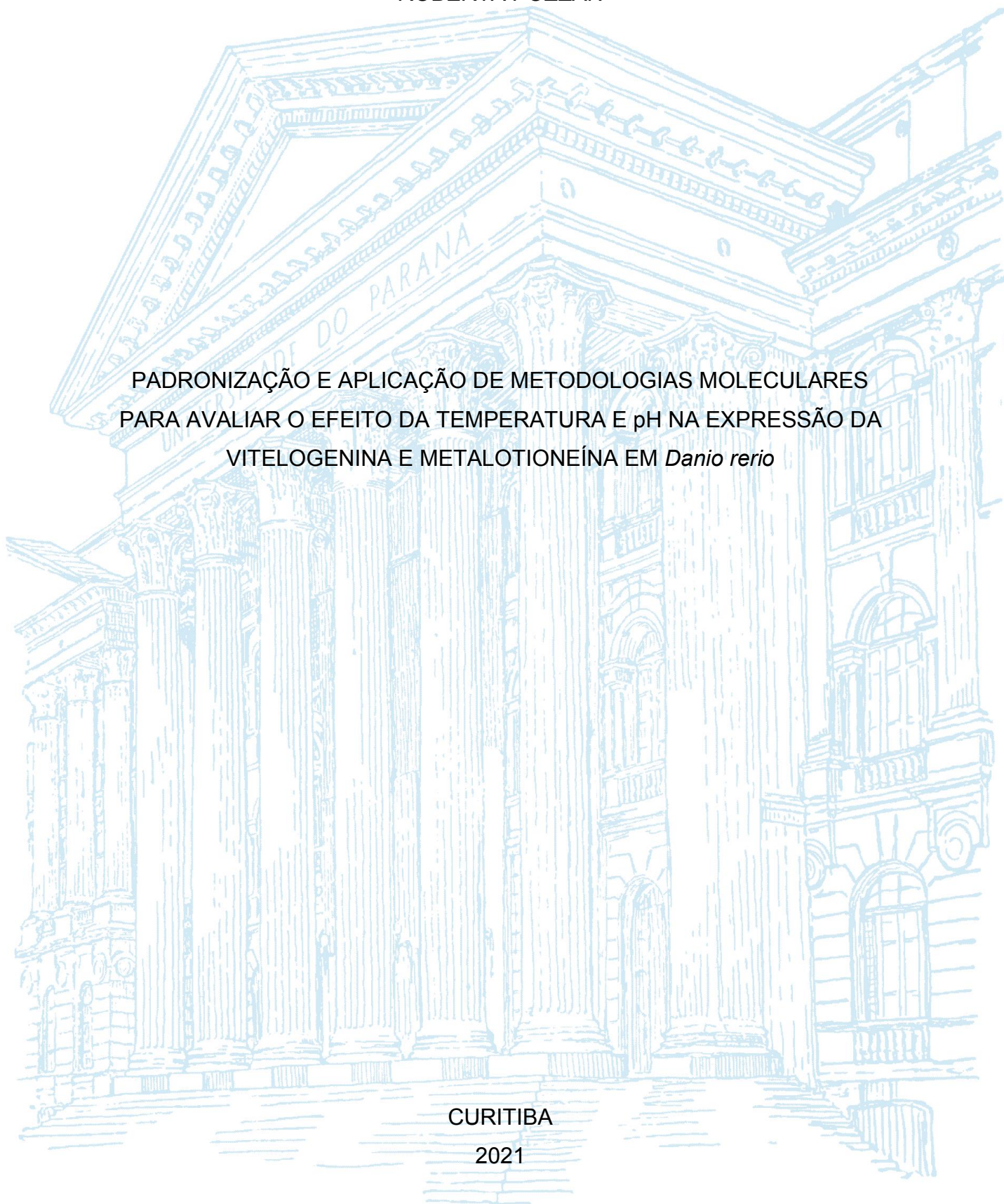
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBERTA POZZAN

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES  
PARA AVALIAR O EFEITO DA TEMPERATURA E pH NA EXPRESSÃO DA  
VITELOGENINA E METALOTIONEÍNA EM *Danio rerio*

CURITIBA

2021



ROBERTA POZZAN

PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES  
PARA AVALIAR O EFEITO DA TEMPERATURA E pH NA EXPRESSÃO DA  
VITELOGENINA E METALOTIONEÍNA EM *Danio rerio*

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e  
Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Coorientador: Dr. Claudemir de Souza

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Pozzan, Roberta.

Padronização e aplicação de metodologias moleculares para avaliar o efeito da temperatura e pH na expressão da vitelogenina e metalotioneína EM *Danio rerio*. / Roberta Pozzan. – Curitiba, 2021.

106 f. : il.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

Coorientador: Claudemir de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Biomarcadores. 2. Bioensaio. 3. Peixes - Pesquisa. 4. Água - Análise. 5. Vitelogeninas. 6. Proteínas – Análise. I. Título. II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira. III. Souza, Claudemir de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 597



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ROBERTA POZZAN** intitulada: **PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES PARA AVALIAR O EFEITO DA TEMPERATURA E pH NA EXPRESSÃO DA VITELÓGENINA E METALOTIONEINA EM *Danio rerio***, sob orientação do Prof. Dr. CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

05/04/2021 11:52:17.0

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/04/2021 14:51:35.0

MARISA FERNANDES DE CASTILHO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/04/2021 17:20:53.0

LUIS FERNANDO FÁVARO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: [pgbiocel@ufpr.br](mailto:pgbiocel@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 87552

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 87552

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador de minha vida, e a meus pais, Marcia e Roberto, e meu irmão, Victor, por apoiarem minhas escolhas e serem os pilares da minha essência como ser humano.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por jamais me abandonar, principalmente nos momentos mais difíceis da minha vida, me dando força e luz para seguir em frente.

À Universidade Federal do Paraná, por todas as oportunidades, por ser minha *Alma mater* e, literalmente, minha segunda casa há mais de 7 anos.

Aos docentes, técnicos, servidores e terceirizados do Setor de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelas oportunidades, suporte, estrutura e assistência.

À COPEL e CAPES pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por todo o conhecimento, confiança e oportunidades.

Ao meu coorientador, Claudemir de Souza, pelo conhecimento, paciência, apoio e ajuda, profissional e pessoal.

Aos professores do Grupo de Toxicologia Celular – UFPR por sua imensa sabedoria e assistência.

À professora Magda, à Silvia, à Zelinda e à Vanessa, por toda ajuda, atenção e suporte.

Aos meus colegas do Grupo de Toxicologia Celular – UFPR, especialmente aos que se tornaram meus amigos (Aliciane, Jéssica, Joelma, Luiza, Mariliza, Melyssa, Michele, Patrícia, Rayanne, Tobias, Tugstênio e Yuri), pelo companheirismo, amizade, palavras de apoio e alento e por toda a ajuda, técnica e pessoal, que me deram.

As minhas amigas, Bruna, Izadora, Jordana e Maria Alice, pelas horas de desabafo e apoio mútuo, sempre me ouvindo e compartilhando as frustrações da pós-graduação.

À minha melhor amiga, Natalia, que me apoia imensuravelmente, me ouve e me acalma, e me faz voltar à racionalidade quando tudo parece estar perdido.

E, mais importante, à minha família, em especial meu pai, minha mãe, meu irmão, à Stefani, e à vó Dora, por tudo, mas principalmente pelo amor e apoio, e por acreditarem em mim, mesmo quando eu mesma não acredito.

A todos, minha imensa e eterna gratidão.

“Eu estou entre aqueles que pensam que a ciência é de uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório é não somente um técnico: ele é também uma criança colocada diante de fenômenos naturais que lhe impressionam como os contos de fada.”

- Marie Curie

## RESUMO

Os estudos de qualidade de água são um grande desafio para a manutenção dos ambientes naturais e da biodiversidade, e as buscas por novas ferramentas são necessárias para atender a essa demanda ambiental. As proteínas metalotioneína (MT) e vitelogenina (VTG) são dois importantes biomarcadores de exposição a poluentes, expressas em peixes quando expostos a metais tóxicos e substâncias estrogênicas, respectivamente. Para investigar se alterações nos parâmetros físicos e químicos interferem na expressão dessas proteínas, e validar sua posterior utilização em biomonitoramento ambiental, exemplares adultos de *Danio rerio* foram mantidos em laboratório sob diferentes temperaturas e pHs, por 4d, 10d, 15d e 20d. Após a exposição, os espécimes foram eutanasiados e preservados a -80°C, homogeneizados e o extrato centrifugado e preservado para análises posteriores. A concentração de proteínas totais foi estimada por espectrofotometria, a 280nm. Frações solúveis resultantes do homogenato foram analisadas pelo ensaio de ELISA quantitativo. Análises de expressão gênica foram realizadas por rt-qPCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores gerados com base na sequência nucleotídica das proteínas MT e VTG de *D. rerio*, obtidas no *GenBank*. A expressão dos genes endógenos Fator de Alongamento e Carreador de Solutos 25α foram utilizadas para normalizar os dados, através do método delta-delta Ct. Os resultados foram analisados estatisticamente para determinar se esses fatores físicos e químicos interferem nesses biomarcadores, permitindo uma melhor interpretação de avaliações da qualidade da água com base em seu uso. Nos ensaios de ELISA, não foram constatadas diferenças significativas na concentração de VTG em nenhum dos tratamentos; em relação à proteína MT também não foram observadas diferenças significativas em relação às diferentes temperaturas testadas. Entretanto, os grupos submetidos a pH extremos (9,0 e 5,0) mostraram diferenças significativas no conteúdo de MT em relação ao grupo controle nos dias 10 e 15 de exposição, recuperando os valores no 20º dia de exposição. A expressão gênica de ambas as proteínas também não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos para machos e fêmeas (exceto machos submetidos aos pHs ao 20º dia, que diminuíram sua expressão de MT). Já entre machos e fêmeas, os únicos grupos que se mostraram diferentes foram as fêmeas submetidas à 25°C e a pH 5,0, para VTG, em relação aos machos controle destes tratamentos. Através destes resultados pode-se concluir que essas proteínas constituem biomarcadores confiáveis em *D. rerio*, uma vez que não aumentam sua expressão gênica ou proteica com a variação da temperatura e pH testados.

Palavras Chaves: biomarcadores, imunodeteção, parâmetros físicos e químicos, bioensaios, peixe-zebra.



## ABSTRACT

Water quality studies are a major challenge for the maintenance of natural environments and biodiversity, and searches for new tools are needed to attend this environmental demand. The proteins metallothionein (MT) and vitellogenin (VTG) are two important biomarkers of exposure to pollutants, expressed in fish when exposed to toxic metals and estrogenic substances, respectively. To investigate whether changes in physical and chemical parameters interfere with the expression of these proteins, and validate its subsequent use in environmental biomonitoring, adult specimens of *Danio rerio* were kept in the laboratory under different temperatures and pHs, for 4d, 10d, 15d and 20d. After exposure, the specimens were euthanized and preserved at -80°C, homogenized and the extract was centrifuged and preserved for further analysis. The concentration of total proteins was estimated by spectrophotometry, at 280nm. Soluble fractions resulting from the homogenate were analyzed by the quantitative ELISA assay. Gene expression analysis were performed by rt-qPCR, using primers generated based on the nucleotide sequence of the MT and VTG proteins of *D. rerio*, obtained from GenBank. The expression of the endogenous Stretching Factor and Solute Carrier 25α genes were used to normalize the data, using the delta-delta Ct method. The results were analyzed statistically to determine whether these physical and chemical factors interfere with these biomarkers, allowing a better interpretation of water quality assessments based on their use. In the ELISA assays, no significant differences were found in the concentration of VTG in any of the treatments; in relation to the MT protein, no significant differences were also observed in relation to the different temperatures tested. However, the groups submitted to extreme pH 9.0 and 5.0 showed significant differences in the MT content in relation to the control group on days 10 and 15 of exposure, recovering the values on the 20<sup>th</sup> day of exposure. Gene expression of both proteins also showed no significant differences between treatments for males and females (except males submitted to pHs on the 20<sup>th</sup> day, which decreased their MT expression). Among males and females, the only groups that were different were females submitted to 25°C and pH 5.0, about VTG, in relation to the control males of these treatments. Through these results it can be concluded that these proteins are reliable biomarkers in *D. rerio*, since they do not increase their gene or protein expression with the tested temperature and pH variation.

Keywords: biomarkers, immunodetection, physical and chemical parameters, bioassays, zebrafish.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE DIFERENTES TIPOS DE ELISA .....	29
FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS DE PCR .....	31
FIGURA 3 – <i>ZEBRAFISH</i> .....	33
FIGURA 4 – AQUÁRIOS DE ACLIMATAÇÃO .....	35
FIGURA 5 – RACK PARA MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE <i>ZEBRAFISH</i> .....	36
FIGURA 6 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PRIMEIRA FASE DOS BIOENSAIOS .....	38
FIGURA 7 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA SEGUNDA FASE DOS BIOENSAIOS .....	39
FIGURA 8 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA TERCEIRA FASE DOS BIOENSAIOS .....	40
FIGURA 9 – COLETA DOS HOMOGENATOS PARA ELISA .....	41
FIGURA 10 – CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM <i>ZEBRAFISH</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS .....	55
FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM <i>ZEBRAFISH</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES PHs .....	56
FIGURA 12 – CONCENTRAÇÃO DE VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS .....	57
FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO DE VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES PHs .....	58
FIGURA 14 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE AMOSTRAS DE RNA DE <i>ZEBRAFISH</i> .....	60
FIGURA 15 – GÉIS DE AGAROSE (1,8%) DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR CONVENCIONAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ANELAMENTO .....	63
FIGURA 16 – CURVAS DE <i>MELTING</i> DOS GENES ENDÓGENOS E DE INTERESSE .....	65
FIGURA 17 – CURVAS DE <i>MELTING</i> DO GENE VITELOGENINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>PRIMER</i> .....	66
FIGURA 18 – EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE METALOTIONEÍNA E	

VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS E PHS .....	68
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS .....	46
TABELA 2 – VARIÁVEIS E CONDIÇÕES TESTADAS NA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ELISA SANDUÍCHE .....	50
TABELA 3 – QUANTIDADE E PUREZA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS DE <i>Danio rerio</i> .....	59
TABELA 4 – QUANTIDADE E PUREZA DO cDNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE <i>Danio rerio</i> .....	61
TABELA 5 – VARIÁVEIS E CONDIÇÕES TESTADAS NA VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	62
TABELA 6 – EFICIÊNCIA, <i>SLOPE</i> E $R^2$ DOS GENES TESTADOS .....	64
TABELA 7 – EFICIÊNCIA, <i>SLOPE</i> E $R^2$ DO GENE VITELOGENINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>PRIMER</i> .....	66

## LISTA DE SIGLAS

AP	– <i>Alcaline phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
ARE	– <i>Antioxidant Responsive Elements</i> (Elementos de resposta à antioxidantes)
BACT	– $\beta$ -actina
cDNA	– <i>complementar DNA</i> (DNA complementar)
CRE	– <i>cAMP Responsive Element</i> (Elementos de resposta à cAMP)
EF	– Fator de elongação 1 $\alpha$
ELISA	– <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
g	– Força centrífuga
GRE	– <i>Glycocorticoid Responsive Element</i> (Elementos de resposta à glicocorticoides)
HRP	– <i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidase de rábano silvestre)
IRE	– <i>Interferon Responsive Element</i> (Elementos de resposta à interferon)
mAb	– Anticorpo monoclonal
MRE	– <i>Metal Responsive Elements</i> (Elementos de resposta à metais)
mRNA	– <i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MT	– Metalotioneína
MTF	– <i>Metal Regulatory Transcription Factor</i> (Fator de regulação de transcrição de metais)
MTR	– Metalotioneína recombinante
pAb	– Anticorpo policlonal

pH	– Potencial hidrogeniônico
qPCR	– <i>Real Time quantitative PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real)
Rpm	– Rotações por minuto
rt-qPCR	– <i>quantitative reverse transcription PCR</i> (PCR quantitativa em tempo real por transcrição reversa)
SLC	– Membro 5 da família de transportadores de soluto 25α
TER	– <i>TPA Responsive Element</i> (Elementos de resposta à ATP)
UV	– Luz ultravioleta
VTG	– Vitelogenina
VTGR	– Vitelogenina recombinante

## LISTA DE ABREVIATURAS

cm	– centímetro (s)
d	– dia (s)
g	– grama (s)
h	– hora (s)
kDa	– quilodalton
L	– litro
mg/L	– miligramas por litro
mg/mL	– miligramas por mililitro
min	– minutos (s)
mM	– milimolar
ng/μL	– nanogramas por microlitro
nm	– nanômetros
pb	– pares de bases
μg/mL	– microgramas por mililitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	– graus celsius
®	– marca registrada
™	– <i>trade mark</i> (marca comercial)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1. OBJETIVO GERAL .....	20
1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1. IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DA TEMPERATURA E pH EM PEIXES .....	21
2.2. BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA .....	22
2.2.1 METALOTIONEÍNA .....	24
2.2.2 VITELOGENINA .....	26
2.3. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA – ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) .....	27
2.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR) .....	30
2.5. <i>Danio rerio</i> COMO MODELO DE ESTUDO MOLECULARES .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1. BIOENSAIOS .....	35
3.2. AVALIAÇÃO PROTEICA PELO MÉTODO DE ELISA SANDUÍCHE ....	41
3.2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS DE ELISA .....	41
3.2.2. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ELISA QUANTITATIVO ..	42
3.2.3. ENSAIOS DE ELISA SANDUÍCHE QUANTITATIVO .....	43
3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA TÉCNICA DE rt-qPCR .....	45
3.3.1. TESTES EM PCR CONVENCIONAL .....	46
3.3.2. TESTES DE OTIMIZAÇÃO DA rt-qPCR .....	47
3.3.3. ENSAIOS DE rt-qPCR .....	48
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS .....	48
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1. PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE ELISA PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> .....	49
4.2. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE METALOTIONEÍNA EM <i>ZEBRAFISH</i> PELO ENSAIO DE ELISA .....	54

4.3.AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> PELO ENSAIO DE ELISA .....	56
4.4. OTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE rt-qPCR PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> .....	58
4.5.AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> .....	67
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1. PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS PARA ELISA .....	69
5.2. PAPEL DA TEMPERATURA E pH NA QUANTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM <i>ZEBRAFISH</i> .....	72
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE 4 .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 1 – APROVAÇÃO E REGISTRO DOS PROCEDIMENTOS PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR .....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 70% da superfície do Planeta Terra é coberta por água. Mas apenas cerca de 2,5% a 3% do volume total de água que há no Planeta Terra é água doce, que se distribui em lagos, riachos, geleiras, aquíferos reservatórios e, somente uma pequena fração (cerca de 0,0002%) são encontrados nos rios (CUNHA e CALIJURI, 2013; HOLZER et al., 2020; NASA, 2020). O conhecimento das propriedades naturais e dos processos bióticos e abióticos que ocorrem nesses ambientes aquáticos é estritamente necessário para uma gestão adequada dos recursos hídricos, garantindo assim qualidade e quantidade de água para uso a longo prazo. As características físicas e químicas dos diversos ambientes aquáticos continentais são definidas principalmente pela geomorfologia do corpo d'água e pelo clima da região geográfica onde estão inseridos (CUNHA e CALIJURI, 2013).

As situações em que se encontram os ambientes aquáticos afetados pela atividade humana são muito complexas e diversas. Os contaminantes presentes nesses ambientes ocorrem geralmente em misturas, e não de forma isolada. Além disso, o efeito tóxico que podem causar nos organismos vivos depende de vários fatores ambientais bem como do tempo de exposição, da concentração dessas substâncias no ambiente, além do sexo, estágio de desenvolvimento e fisiologia desses organismos (MIRACLE, 2014). Neste contexto, as análises físicas e químicas dos ambientes não geram dados suficientes e específicos sobre a condição ambiental, sendo necessárias avaliações químicas e biológicas para se obter uma avaliação mais completa do impacto de contaminantes nos ecossistemas aquáticos. Portanto, uma abordagem biológica é altamente recomendável, pois permite avaliar a saúde dos organismos que vivem em ecossistemas sujeitos à degradação, bem como compreender os efeitos biológicos causados pelas interações entre os poluentes e os seres vivos (VASSEUR e COSSU-LEGUILLE, 2003).

O crescente aumento da população mundial nas últimas décadas e as demandas por novos produtos, levam a atividades antrópicas desordenadas criando um paradigma na sociedade moderna. Tais pressões sobre os

ambientes naturais aumentam a demanda constante por recursos hídricos, ao mesmo tempo em que geram continuamente resíduos urbanos, agrícolas e industriais que são lançados muitas vezes diretamente nos corpos d'água. Como consequência, essas atividades podem comprometer a biota aquática e levar à perda de espécies aquáticas afetando drasticamente a biodiversidade (BARRETO et al., 2020), bem como diminuindo a qualidade da água tornando-a imprópria para o consumo humano (COSTA, 2012). Deste modo, os peixes constituem ótimos indicadores de contaminação ambiental aquática, pois, além de habitarem o ambiente aquático e, portanto, se encontrarem expostos diretamente a esses xenobióticos, seu metabolismo é semelhante ao dos vertebrados superiores (BALBINOT et al., 2014).

Os dados relacionados com a exposição de xenobióticos em organismos aquáticos, como os peixes, variam muito em função da biodisponibilidade dessas moléculas. A biodisponibilidade de xenobióticos compreende a fração do xenobiótico que consegue transpassar as barreiras biológicas do organismo (como a membrana plasmática das células epiteliais). Quando o contaminante atravessa a membrana celular e, portanto, encontra-se dentro da célula há inicialmente uma combinação com moléculas e macromoléculas afins, podendo se combinar com organelas celulares. Essas interações totalmente aleatórias, interferem ou não com a estrutura, funcionamento ou metabolismo celular. No entanto, se a concentração dos xenobióticos atinge níveis não mais tolerados pela célula, seus efeitos tóxicos podem ser observados (BIANCHINI et al., 2009). Dentre o conjunto de fatores físicos e químicos que afetam a biodisponibilidade dos xenobióticos no ambiente aquático natural, e que apresentam também importância fisiológica em organismos aquáticos, estão a temperatura e o pH. (STEFFEN et al., 2011; PANKHURST e HERBERT, 2013; WOOD et al., 2018).

A biodisponibilidade de um elemento, molécula ou mesmo de um composto depende muito das condições físicas e químicas ambientais, pois essas podem interferir com a forma ou estado químico do xenobiótico e sua consequente solubilidade ou precipitação, o que vai afetar a capacidade de vencer a barreira biológica. Organismos aquáticos vivem em um ambiente complexo, onde ocorrem inúmeros processos de transferências, trocas e mudanças químicas (MOZETO e ZAGATTO, 2006). São essas mudanças químicas e físicas que podem favorecer ou não a relação do xenobiótico com as

barreiras biológicas, o que é denominado de biodisponibilidade. Portanto, quanto maior for a biodisponibilidade de um xenobiótico, maior é sua capacidade de vencer o conjunto de obstáculos físicos e químicos, que funcionam como filtros do organismo, impedindo que moléculas exógenas cheguem às células, tecidos e órgãos de organismos vivos (ROCKS e DAWSON, 2014).

A avaliação da qualidade de água é hoje um grande desafio para os estudos ambientais bem como os de saúde pública. A atividade antrópica tem, nas últimas décadas, comprometido os mais diversos ecossistemas aquáticos continentais e avaliar tais impactos passa necessariamente pela análise da qualidade da água. O uso de ferramentas moleculares e biotecnológicas que possibilita avaliar precocemente os efeitos da exposição dos seres vivos em relação aos poluentes presentes na água é extremamente importante para as avaliações de impactos ambientais. Essa avaliação deve levar em conta os fatores bióticos e abióticos que afetam de forma diferente a fisiologia de cada espécie. Os resultados dessas análises permitem a discussão de ações de gerenciamento ambiental a fim de mitigar os potenciais danos para esses ambientes, impedindo impactos a longo prazo para a comunidade local (MELENDEZ et al., 2012).

Uma importante ferramenta na avaliação da qualidade da água, é o uso dos biomarcadores moleculares de exposição, como por exemplo a quantificação da expressão de duas proteínas chaves, a metalotioneína (como biomarcador de exposição a metais tóxicos) e a vitelogenina (como biomarcador de exposição a poluentes estrogênicos) (VERBINNEN, 2014; DALZUCHIO et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2018). Para que essas proteínas sejam utilizadas como biomarcadores de qualidade de água, se faz necessário a realização de pesquisas e análises aprofundadas sobre sua síntese e estrutura, assim como a investigação da interferência de parâmetros físicos e químicos na expressão da metalotioneína e vitelogenina em vertebrados aquáticos.

A avaliação da presença ou não de poluentes na água não é mais suficiente se utilizada de forma isolada para compreender como essas substâncias impactam a biodiversidade local. Se a questão não é risco em potencial, mas risco real de exposição a determinados poluentes, os protocolos de avaliação química da água não refletem a condição real do ambiente e dos seres vivos que nele vivem (FERNANDES, 2005; BRITO et al., 2012; SOUZA et

al., 2013; SILVA et al., 2020). Portanto, estamos buscando utilizar a expressão dessas proteínas como biomarcadores moleculares em peixes, e é importante e necessário saber se oscilações de parâmetros físicos e químicos como temperatura e pH, podem interferir na expressão das mesmas nesses organismos, resultados importantes para a normalização e validação desses métodos. Assim, os dados obtidos em bioensaios permitem uma normalização para efetivar os resultados de campo, bem como o estabelecimento de limiares de resposta que indiquem se o efeito observado é devido à presença de xenobióticos biodisponíveis, e não devido às interferências de parâmetros como o pH e a temperatura. Essa é uma importante condição para validar com qualidade o uso da expressão da metalotioneína e vitelogenina como biomarcadores de qualidade de água.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

Logo, o objetivo geral deste trabalho foi testar a hipótese de que as variações nos parâmetros físicos e químicos, como temperatura e pH, interferem nos padrões de expressão da vitelogenina e da metalotioneína em espécimes de *Danio rerio*, desenvolvendo e aplicando métodos de biologia molecular, como ELISA e rt-qPCR.

#### 1.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho, foram:

- desenvolver e padronizar protocolos para o ensaio de ELISA quantitativo para análises de MT e VTG em *D. rerio*;
- desenvolver e padronizar protocolos de rt-qPCR para análises de expressão gênica relativa de MT e VTG em *D. rerio*;
- verificar o efeito da temperatura e pH nos níveis de VTG e MT em *D. rerio* em diferentes tempos de exposição;
- validar os biomarcadores VTG e MT em *D. rerio*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA DA TEMPERATURA E pH EM PEIXES

A temperatura é uma medida de energia cinética média de um corpo e descreve o potencial de transferência de calor de um corpo em alta temperatura para outro corpo, com temperatura menor que o primeiro, até que ambos os corpos atinjam equilíbrio, na mesma temperatura (HOWELLS, 2018), e encontra-se relacionada também com a solubilidade de compostos químicos na água (AHEL e GIGER, 1993; INABA et al., 1995; STEFFEN et al., 2011). A diminuição da temperatura, por exemplo, aumenta a solubilidade de compostos orgânicos dissolvidos na água, os quais possuem alta afinidade com os metais, podendo formar complexos que alteram a especiação e, conseqüentemente, a biodisponibilidade dos metais na água (BIANCHINI, 2009).

A temperatura é um dos principais parâmetros físicos que influencia o metabolismo e fisiologia de animais ectotérmicos, como os peixes, uma vez que seu organismo segue as mudanças de temperatura no ambiente em que estão inseridos (LE MORVAN et al., 1998; PIANA et al., 2003; PERRY et al., 2010; SADATI et al., 2011; STRAND et al., 2011; PANKHURST e HERBERT, 2013). Apesar dos peixes apresentarem amplas faixas de tolerância térmica, cada espécie possui uma temperatura ideal para alcançar o desempenho metabólico ótimo, mas, dentro de limites, geralmente sua taxa metabólica aumenta com o aumento da temperatura (SCHMIDT-NIELSEN, 1996a; ROCHA et al., 2001; PERRY et al., 2010).

Mudanças na temperatura do ambiente em que esses animais vivem afetam a estrutura e função de proteínas, enzimas e lipídios, o funcionamento de organelas celulares, a permeabilidade e função de membranas celulares e, conseqüentemente, muitos processos fisiológicos, como a resposta imune frente à patógenos e substâncias exógenas (WARDLE, 1980; DANTZLER, 1997; LE MORVAN et al., 1998; HILL et al., 2012a; PANKHURST e HERBERT, 2013). Uma classe de biomoléculas muito influenciada pela temperatura são as enzimas, que normalmente apresentam atividade ótima em uma faixa específica de temperatura, e fora desta faixa têm sua função e estrutura alteradas (EDMUNDS et al., 2009; PERRY et al., 2010; HANDY e EDDY, 2012; ALBERTS

et al., 2017).

Quando a temperatura diminui, por exemplo, a permeabilidade das membranas celulares tende a diminuir e a perder fluidez e, conseqüentemente, suas funções são prejudicadas, o que é recuperado, em alguns organismos, pela adição de ligações duplas nos lipídios que as constituem (CROCKETT, 2008; HANDY e EDDY, 2012; ALBERTS et al., 2017). Já em temperaturas altas, o aumento da permeabilidade celular com o aumento da temperatura facilita as trocas gasosas e a osmorregulação em peixes, levando a um maior desempenho fisiológico de sistemas como o cardíaco e o muscular (STEWART, 1991; HANDY e EDDY, 2012; HILL et al., 2012a; HILL et al., 2012b).

O pH, ou potencial hidrogeniônico, foi proposto para expressar a concentração de íons hidrogênio em soluções aquosas, que é diretamente imensurável e requer uma convenção para sua avaliação. Na escala de pH, estabelecida entre 0 a 14, valores acima de 7 indicam pH básico enquanto valores abaixo de 7 indicam pH ácido. Assim o pH 7 é o pH denominado neutro (IUPAC, 2002).

Sabe-se que o pH têm grande influência sobre a especiação e solubilidade dos xenobióticos, como metais, antibióticos e agroquímicos, determinando seu grau de hidrólise, polimerização, agregação, precipitação e toxicidade em ambientes aquosos (YU et al., 1994; ARCAND, et al., 1995; INABA et al., 1995; BIANCHINI et al., 2009). Em pHs ácidos, por exemplo, ocorre um aumento na dissociação dos metais elevando as concentrações de suas formas iônicas no meio (BIANCHINI et al., 2009).

Mudanças no pH da água interferem principalmente no fluxo iônico dos peixes, onde a exposição a baixos valores de pH, por exemplo, aumenta o efluxo de alguns cátions pelas brânquias, aumentando a perda de íons e causando um desequilíbrio na osmorregulação desses animais (EVANS e CLAIBORNE, 2006; PERRY et al., 2010; WOOD et al., 2018). Já valores altos de pH parecem diminuir a excreção de amônia, causando sua acumulação no sangue e tecido e, conseqüentemente, toxidade (WRIGHT, 1993; SAHA et al., 2002; WOOD et al., 2018).

## 2.2. BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA



Os compostos químicos estranhos aos organismos vivos ou aos sistemas biológicos, denominados de xenobióticos, impactam hoje seriamente os ambientes naturais no qual são encontrados, frequentemente trazendo consequências tóxicas para a biota inserida nesses ecossistemas. A mensuração dessas alterações, que podem ser a nível molecular, bioquímico, celular, tecidual, bem como fisiológico e comportamental, são utilizadas na Ecotoxicologia e no monitoramento ambiental, onde são denominadas de biomarcadores. Os biomarcadores não apenas indicam a exposição dos seres vivos a substâncias tóxicas, como também tem uma importância preditiva que permite compreender de que forma a biota está sendo afetada, e o que essa exposição pode acarretar em níveis de organização biológica mais complexos como populações e comunidades (FERNANDES, 2005; SOUZA et al., 2013).

Os biomarcadores são divididos em três categorias: de exposição, de efeito e de suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição são considerados respostas celulares a xenobióticos, seus metabólitos ou os produtos de sua interação com algum componente, molecular ou estrutural, do ser vivo exposto à essas substâncias. Os biomarcadores de efeito compreendem qualquer alteração mensurável, a nível bioquímico, fisiológico ou comportamental dentro de um organismo exposto ao xenobiótico, que pode ser considerada como um dano e que pode se desenvolver em algum tipo de doença. E por fim, os biomarcadores de suscetibilidade abrangem habilidades adquiridas pelo organismo, o que lhe permite enfrentar a exposição à substâncias tóxicas alterando assim a sua suscetibilidade a essa exposição (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1993; FERNANDES, 2005).

Os biomarcadores tem sido amplamente utilizados em estudos de biomonitoramento de ecossistemas aquáticos, ou mesmo em estudos de bioensaios com diferentes níveis de organização biológica. Os biomarcadores permitem compreender e mensurar como se dá a relação entre os xenobióticos presentes na água e os organismos que ali residem, auxiliando programas de mitigação bem como no estabelecimento de políticas públicas para proteger esses ambientes (FERNANDES, 2005; BRITO et al., 2012; SOUZA et al., 2013; DALZUCHIO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2020).

Dentre os biomarcadores de exposição, dois tipos se destacam, que é a

expressão de metalotioneína na avaliação de metais tóxicos, e de vitelogenina, principalmente em machos, na avaliação de poluentes estrogênicos, em peixes (FERNANDES, 2005; DALZUCHIO et al., 2016).

### 2.2.1. METALOTIONEÍNA

As metalotioneínas (MT) são proteínas expressas em todos os animais, algumas plantas, fungos e bactérias, compondo uma família de proteínas não-enzimáticas, ricas em cisteína e metalopeptídeos de baixo peso molecular (2-12kDa) e apresentam grande resistência em altas temperaturas. Devido ao seu alto teor de grupos tióis (-SH), provenientes de resíduos de cisteína, as MTs se ligam a diversos metais não essenciais, incluindo cádmio, mercúrio, platina e prata, e à metais essenciais, como cobre, cobalto e zinco. Geralmente, quando estão presentes nas células essas proteínas encontram-se ligadas a vários metais diferentes (AMIARD et al., 2006; MELENDEZ et al., 2012).

Desta forma, as principais funções biológicas das MTs estão relacionadas com a detoxificação, sequestro e armazenamento de metais (metallorregulação) em células e tecidos, protegendo-os da toxicidade dos metais pesados ou funcionando como uma reserva de metais essenciais, como zinco e cobre, controlando assim sua homeostase intracelular (ROESIJADI, 1996; AMIARD et al., 2006; THIRUMOORTHY et al., 2007; MELENDEZ et al., 2012). Quando metais não-essenciais, como cádmio, mercúrio e prata, entram na célula, eles competem por ligantes intracelulares com as moléculas de metais-essenciais ali presentes, e a MT desempenha, então, um papel de agente detoxificador, ligando-se aos metais que são tóxicos para a célula (AMIARD et al., 2006).

As MTs também auxiliam na proteção das células contra o estresse oxidativo através do controle de radicais livres, como hidroxila (OH) e superóxido ( $O_2^-$ ), moléculas que, por serem extremamente reativas, reagem com várias biomoléculas no interior celular na chamada cascata oxidativa (RODRIGUES, 2007).

O comportamento das MTs é ditado principalmente pelos grupos tióis e, qualquer metal com características estequiométricas parecidas com zinco ou cobre pode ligar-se a elas (AMIARD et al., 2006). Essas proteínas apresentam isoformas, e diferenças em sua massa molecular sugerem formas monoméricas

e diméricas, sendo que as sequências Cis-Cis, Cis-X-Cis e Cis-X-Y-Cis (sendo X e Y diferentes aminoácidos) permitem sua classificação filogenética em 15 famílias, que é complementada com uma classificação funcional, baseada nas propriedades de ligações aos metais (ZILLER e FRAISSINET-TACHET, 2018).

Os vários fatores de transcrição gênica dessas proteínas se ligam a sequências regulatórias localizadas na região promotora 5' das MTs. Dentre as sequências regulatórias, podem ser citadas MRE (*Metal Responsive Elements*), ARE (*Antioxidant Responsive Elements*), GRE (*Glycocorticoid Responsive Elements*), CRE (*cAMP Responsive Elements*), TER (*TPA Responsive Elements*) e IRE (*Interferon Responsive Elements*). O fator de transcrição MTF (*Metal Regulatory Transcription Factor*) é induzido por metais pesados por meio dos elementos de resposta à metais (MRE), presentes em muitas cópias nos promotores proximais do gene e ativados por um inibidor sensível à zinco, por exemplo (AMIARD et al., 2006; BOURDINEAUD et al., 2006; ZILLER e FRAISSINET-TACHET, 2018).

Quanto mais diretamente envolvido na absorção, armazenamento e eliminação de metais o tecido estiver, maior sua capacidade de sintetizar MTs. Nos peixes, os órgãos que parecem ter maiores concentrações de MT são brânquias, rim e fígado, que estão envolvidos diretamente na absorção e detoxificação de metais (CHOWDHURY et al., 2005; ALVARADO et al., 2007; ROSE et al., 2014).

Desde a sua descoberta por Margoshes e Vallee, em 1957, no córtex renal de equinos, muitos estudos de caracterização e funcionamento destas proteínas têm sido realizados, em vários seres vivos. Assim como essas proteínas são muito sensíveis à biodisponibilidade de metais nos ambientais naturais, são consideradas ótimos biomarcadores de exposição (FERNANDES, 2005; RODRIGUES, 2007; DALZUCHIO et al., 2016). Em geral, têm sido utilizadas para detectar e estudar a exposição de seres vivos a metais, podendo ser aplicadas em diferentes espécies aquáticas em avaliações de impacto ambiental onde esses organismos estão inseridos, incluindo peixes (HAMZA-CHAFFAI et al., 1995; VIARENGO et al., 2001; INÁCIO, 2006; MELENDEZ et al., 2012; BERVOETS et al., 2013; DOERING et al., 2015; FABRIN et al., 2018).

### 2.2.2. VITELOGENINA

A vitelogenina (VTG) é uma grande fosfolipoglicoproteína, presente no plasma de fêmeas de vertebrados ovíparos, como os peixes. É sintetizada no fígado durante a maturação sexual pela regulação hormonal, onde o hormônio  $17\beta$ -estradiol produzido nas gônadas tem papel essencial (JONES et al., 2000; ARAÚJO, 2012). Após a secreção do hormônio nas gônadas pela estimulação do eixo hipotálamo-hipofisário, chega ao fígado do animal, onde se liga a receptores de estradiol impulsionando a síntese da VTG (NILSEN et al., 2004; COSTA, 2012). Depois de sintetizada nos hepatócitos, a VTG é transportada até o plasma, através do qual chega aos ovários onde é incorporada ao oócito por endocitose e processada por clivagem em duas proteínas (fosvitina e lipovitelina) para formar o vitelo (SUMPTER e JOBLING, 1995; JONES et al., 2000; NILSEN et al., 2004; DAVID, 2012; READING et al., 2017).

O peso molecular da VTG nativa multimérica no soro de peixes parece ser espécie-dependente, variando de 350-600kDa, sendo que o peso molecular da subunidade proteica varia de 150-180kDa (JONES et al., 2000). Diferentes pesos moleculares (155, 130 e 120kDa) de VTG purificada de *zebrafish* foram relatados, sendo 155kDa provavelmente o peso da proteína inteira, enquanto os pesos de 130 e 120kDa sejam de diferentes monômeros da proteína na espécie ou de produtos de degradação proteica (NILSEN et al., 2004). Apesar da síntese de VTG ser regulada pelo estradiol, outros fatores também parecem interferir nesse processo. O sexo, idade, estágio de desenvolvimento reprodutivo, hormônios endógenos, comportamento, temperatura corporal e estações do ano são algumas das condições já relatadas que têm influência na produção e liberação de VTG para o plasma (JONES et al., 2000).

A VTG é produzida normalmente apenas em fêmeas, que apresentam altos níveis de VTG no plasma quando sexualmente maduras. Peixes machos, apesar de também possuírem receptores estrogênicos no fígado e os genes para proteína, têm expressão fraca uma vez que possuem níveis insignificantes de estrógenos circulantes no organismo (SUMPTER e JOBLING, 1995; NILSEN et al., 2004; COSTA, 2012; DAVID, 2012; CHAVES, 2016). No entanto, a produção de VTG em peixes machos, pode ser desencadeada pela presença de outras

substâncias como os poluentes, que apresentam a capacidade de agir como estrógenos ou agentes estrogênicos no ambiente. Sendo assim, se os níveis dessa proteína aumentarem significativamente no plasma, fígado ou gônadas de machos, sinaliza um desequilíbrio endócrino no organismo. Portanto, a quantificação dessa proteína, ou sua expressão, é um potente biomarcador de exposição para desregulação endócrina, significando que existe no ambiente a biodisponibilidade de substâncias que apresentam um papel estrogênico. Estudos têm utilizado essa ferramenta na avaliação de quantidades anormais de estrógenos liberados em produtos químicos, efluentes ou descargas de esgoto nos ambientes aquáticos (NILSEN et al., 2004; COSTA, 2012; DAVID, 2012; CHAVES, 2016).

A expressão da VTG é utilizada também para avaliar o efeito de atividades estrogênicas na desregulação endócrina em machos ou juvenis, ou atividades anti-estrogênicas na desregulação endócrina em fêmeas ovíparas. Essas respostas confirmam a presença e a biodisponibilidade de substâncias de ação estrogênica nos ambientes onde animais ovíparos estão inseridos (VERBINNEN, 2014). Portanto, essa proteína demonstra ser um excelente biomarcador principalmente em avaliações de contaminação xenoestrógena em vertebrados aquáticos como os peixes (JONES et al., 2000; ARUKWE e GOKSØYR, 2003).

Apesar de geralmente estar em grande quantidade no plasma de fêmeas de vertebrados ovíparos (10-100mg/mL) e de peixes sob estrogenização, e de ser relativamente fácil de se purificar, a VTG é uma proteína que apresenta grande instabilidade e alta suscetibilidade à degradação proteolítica, principalmente devido ao fato de ela ser precursora de fragmentos peptídicos (JONES et al., 2000; NILSEN et al., 2004). Além disso, os limites de sua concentração, entre peixes não expostos a estrógenos e peixes expostos, pode variar muito (NILSEN et al., 2004).

### 2.3. ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA – ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Uma das técnicas que pode ser utilizada na detecção de proteínas, incluindo os biomarcadores VTG e MT, é o teste ELISA (Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay) ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. Esse ensaio é uma técnica sensível, específica e robusta, amplamente utilizada para detecção qualitativa e quantitativa de anticorpos e antígenos em vários tipos de amostras biológicas (NILSEN et al., 2004; CROWTHER, 2009; GAN e PATEL, 2013; HOSSEINI et al., 2018).

O ELISA foi desenvolvido pelos pesquisadores suecos Peter Perlmann e Eva Engvall, na década de 1960, e o primeiro artigo utilizando a técnica foi publicado em 1971, onde estes mesmos pesquisadores mostraram a detecção quantitativa de IgG em soro de coelho, utilizando fosfatase alcalina como molécula repórter. Desde então, muitos laboratórios fazem uso desta técnica em diagnósticos médicos, industriais e ambientais (ENGVALL e PERLMANN, 1971; LEQUIN, 2005; CROWTHER, 2009; GAN e PATEL, 2013).

Os ensaios de ELISA podem ser qualitativos (permitem detectar a molécula-alvo na amostra) ou quantitativos (permitem mensurar a quantidade de molécula-alvo na amostra). Estes ensaios podem ainda ser de detecção direta ou indireta. Nos ensaios diretos, a molécula de revelação da reação é acoplada diretamente no anticorpo específico contra o antígeno-alvo. Já nos ensaios indiretos, os anticorpos não possuem nenhuma molécula conjugada e, desta forma, requerem a utilização de um outro anticorpo que esteja conjugado com a molécula que irá permitir a revelação do ensaio, seja pela emissão de cor ou luz. Os formatos de ELISA mais utilizados são o de captura, o sanduíche e o competitivo. (CROWTHER, 2009; GAN e PATEL, 2013).

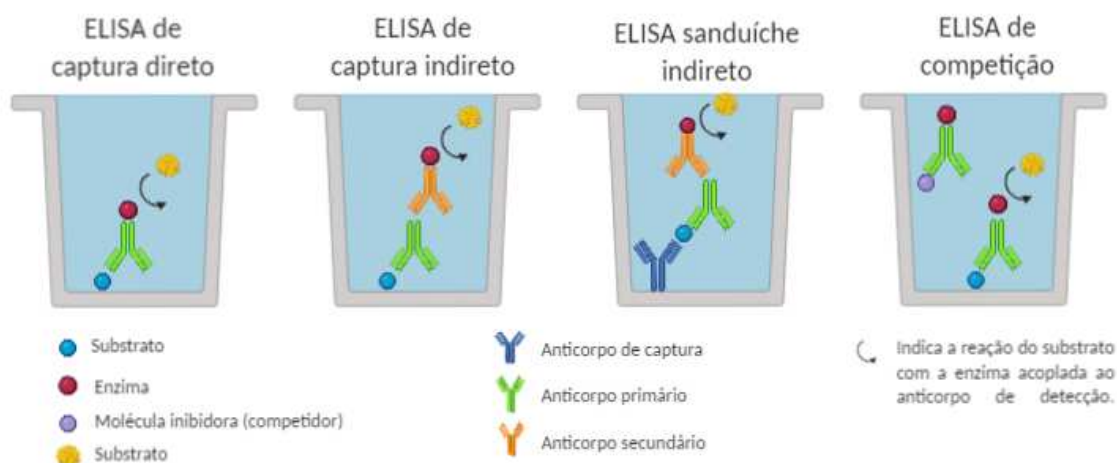
No ELISA de captura indireto, o antígeno é aderido à uma microplaca e, então, reconhecido pelo anticorpo primário. Após a adição do anticorpo primário, um segundo anticorpo, conjugado com uma enzima ou fluoróforo, é adicionado à placa, reconhecendo e interagindo com o anticorpo primário. Um substrato é adicionado, reagindo com a enzima do anticorpo conjugado, gerando cor. Portanto, a intensidade da cor revela a concentração de antígeno na amostra. Sua principal desvantagem é a baixa especificidade na imobilização do antígeno (CROWTHER, 2009; GAN e PATEL, 2013; HOSSEINI et al., 2018).

No método do ELISA sanduíche indireto, utiliza-se um par de anticorpos, um anticorpo de captura, imobilizado na placa (que se liga ao antígeno de interesse na amostra), e um anticorpo de detecção (que detecta o antígeno capturado pelo primeiro anticorpo). O anticorpo de captura geralmente é

diferente do anticorpo utilizado para detecção, para tentar impedir que ocorra reação cruzada (interferência entre os anticorpos quando estes se ligam aos mesmos epítopos) (NILSEN et al., 2004). Um anticorpo secundário, conjugado à enzima ou fluoróforo, reconhece e se liga ao anticorpo primário (de detecção), e logo em seguida reage com o substrato adicionado. A emissão de cor ou luz pode ser quantificada posteriormente (NILSEN et al., 2004; CROWTHER, 2009; GAN e PATEL, 2013; HOSSEINI et al., 2018).

O anticorpo primário é incubado com a amostra contendo o antígeno de interesse, e então o complexo anticorpo-antígeno é adicionado na placa, já sensibilizada com o antígeno, no processo de ELISA competitivo. Após lavagens, os anticorpos não ligados ao antígeno da placa, serão removidos. Portanto, quanto mais antígeno na amostra, mais anticorpo se ligará a este e, consequentemente, menos anticorpo se ligará no antígeno sensibilizado na placa. Assim, a ausência de cor ou reação com o substrato é o que indica a presença de antígeno na amostra, ao contrário dos outros tipos de ELISA. Este método apresenta alta sensibilidade (CROWTHER, 2009; GAN e PATEL, 2013; HOSSEINI et al., 2018).

FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE DIFERENTES TIPOS DE ELISA



FONTE: O autor (2021)

Nota: Elaborado em BioRender.com.

Atualmente, o ELISA é empregado em várias áreas, como no desenvolvimento de vacinas (MIURA et al., 2008; VORONIN et al., 2015; SMALLEY et al., 2016;), estudos de imunologia e toxicologia (APOLLONIO et al., 2007; BOBOSHA et al., 2014; HSU et al., 2014; TERATO et al., 2014), em

diagnósticos (NANDI et al., 2014; LAURICELLA et al., 2016; SCHIEFFELIN et al., 2016; SENAPATI et al., 2016), e até mesmo na indústria farmacêutica e alimentícia (ASENSIO et al., 2008; PENG et al., 2014; IVENS et al., 2016). Além disso, o seu uso como ferramenta de diagnóstico ambiental também tem sido recorrente, incluindo estudos que utilizam biomarcadores de contaminação aquática em peixes, como VTG (PECK et al., 2011; GARNAYAK et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2017; LI et al., 2018) e MT (CHU et al., 2006; SINAIE et al., 2010; ADAM et al., 2019).

#### 2.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

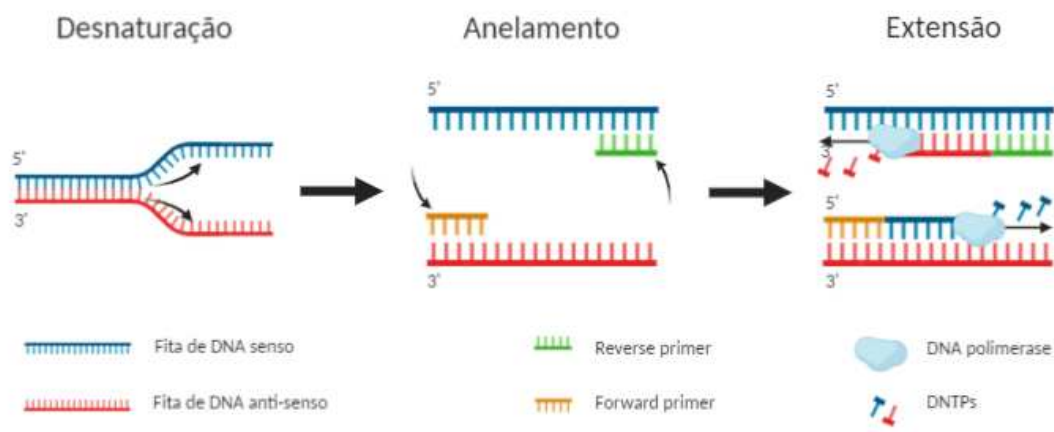
Além do ELISA, uma outra forma de mensurar a presença de biomarcadores em uma amostra biológica é utilizando a PCR, ou Reação em Cadeia da Polimerase (de Polymerase Chain Reaction) (TOM et al., 2004; MA et al., 2013; RAWAT et al., 2013). A PCR é uma técnica que amplifica uma ou poucas cópias de um fragmento de DNA em milhões de cópias, do mesmo fragmento, através de ciclos de temperatura. A PCR foi desenvolvida na década de 1980, apesar do princípio da replicação do DNA utilizando iniciadores ter sido descrito já em 1970. Nos últimos anos, a PCR tem sido uma das técnicas de biologia molecular mais utilizadas e necessárias, principalmente por ser muito sensível, simples, rápida e de custo acessível (KUBISTA et al., 2006; LO et al., 2006; JOSHI e DESHPANDE, 2010; GARIBYAN e AVASHIA, 2013; GREEN e SAMBROOK, 2019).

Os ciclos de temperatura da técnica basicamente consistem em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na etapa da desnaturação, a fita molde, ou alvo, de DNA é desnaturada, ou seja, sofre a separação de sua estrutura dupla-hélice, através de altas temperaturas (geralmente 90°C). Logo em seguida, na segunda etapa, ocorre o anelamento (50-60°C) de dois oligonucleotídeos sintéticos iniciadores, denominados *primers*, que são desenhados a partir do conhecimento prévio da sequência alvo para serem complementares a ela. Após o anelamento dos *primers*, começa a etapa de extensão, que consiste na síntese de uma nova fita de DNA, catalisada pela DNA polimerase, em temperaturas que normalmente variam de 55 a 70°C (KUBISTA et al., 2006; JOSHI e DESHPANDE, 2010; GARIBYAN e AVASHIA, 2013;



GREEN e SAMBROOK, 2019).

FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ETAPAS DE PCR



FONTE: O autor (2021)

Nota: Elaborado em BioRender.com.

Esses ciclos de temperatura são reproduzidos de 25-35 vezes aproximadamente, em aparelhos específicos para a técnica, denominados de termocicladores, que controlam as temperaturas em cada etapa de cada ciclo, possibilitando que, teoricamente, as cópias de DNA alvo se dupliquem em cada ciclo, gerando um aumento exponencial dos fragmentos de DNA ( $2^n$ , sendo  $n$  o número de ciclos utilizados), até que a concentração de *primers* e de trifosfatos de desoxinucleotídeo (dNTPs) se tornem insuficientes. O produto da PCR pode ser visualizado e analisado em géis de eletroforese, após a reação ser completada (JOSHI e DESHPANDE, 2010; GREEN e SAMBROOK, 2019).

Com o passar do tempo, muitas variantes da PCR foram desenvolvidas. A PCR quantitativa em tempo real (Real Time qPCR), permite a amplificação do DNA alvo e sua simultânea quantificação. Ou seja, utilizando o mesmo princípio de ciclagem de temperatura da PCR convencional, a qPCR permite que o produto de PCR seja analisado enquanto as reações de amplificação ainda estão ocorrendo. Isso é possível através do uso de marcadores fluorescentes, que emitem fluorescência quando reagem com os fragmentos dupla-fita recém-sintetizados (JOSHI e DESHPANDE, 2010; GREEN e SAMBROOK, 2019).

Para a detecção e quantificação de expressão gênica, utilizando mRNA como substrato, existe a PCR quantitativa de transcrição reversa (rt-qPCR, de

Reverse Transcription qPCR), que pode ser utilizada com o método de Real Time PCR. Nesta variante, o mRNA funciona como substrato da enzima transcriptase reversa que, a partir da fita única de RNA e de *primers* que se alinham a essa fita, sintetiza uma fita única de DNA complementar (cDNA, de Complementar DNA) ao RNA, gerando um híbrido cDNA-mRNA; o mRNA é depois parcialmente degradado pela RNase H, e substituído por fitas de DNA sintetizadas pela DNA polimerase I. O cDNA dupla fita é então utilizado na Real Time qPCR, permitindo mensurar a expressão gênica através dos níveis de mRNA do organismo ou célula (VALASEK e REPA, 2005; KUBISTA et al., 2006; GARIBYAN e AVASHIA, 2013; GREEN e SAMBROOK, 2019).

As aplicações da técnica de PCR e suas variantes são inúmeras, tanto em laboratórios de diagnóstico (sejam humanos, de outros animais, ou ainda industriais e alimentícios), quanto em laboratórios de pesquisa científica. Em laboratórios de biologia molecular, por exemplo, a PCR pode ser empregada em procedimentos de clonagem, de sequenciamento de DNA, de avaliações de expressão gênica, e em diagnósticos e estudos de doenças e anomalias genéticas (LO et al., 2006; JOSHI e DESHPANDE, 2010; LUTHRA et al., 2016). Na área da toxicologia celular e ambiental, a análise da expressão gênica também é de grande aplicabilidade, uma vez que as células normalmente respondem a alterações nos parâmetros ambientais com a ativação ou síntese de proteínas relacionadas ao estresse, que agem para compensar os danos causados ao organismo por esses agentes estressores (SNELL et al., 2003; PIÑA et al., 2007; MEYER, 2010; GAGNÉ, 2014).

## 2.5. *Danio rerio* COMO MODELO DE ESTUDO MOLECULARES

Uma das espécies mais utilizadas em experimentação animal é o *Danio rerio*, comumente denominado *zebrafish*, peixe-zebra ou paulistinha. O *zebrafish* é um peixe teleósteo de pequeno porte (3 a 4cm), nativo do sul e leste da Ásia (Paquistão, Myanmar, Nepal e Índia), tropical, dulcícola, ovíparo e onívoro. Ele é encontrado em águas calmas, geralmente com vegetação, em temperaturas que variam de 24°C a 38°C, com condutividade de 10 a 271µS e pH 6,0 a 8,0. Além disso, apresenta comportamento social, reprodução sazonal e sutil dimorfismo sexual (RICO, 2007; PERRY et al., 2010; BALBINOT et al., 2014).

FIGURA 3 – ZEBRAFISH



FONTE: Rede Zebrafish ([www.redezebrafish.com.br](http://www.redezebrafish.com.br))

Nota: Zebrafish fêmea (parte superior); zebrafish macho (parte inferior).

Essa espécie é considerada um modelo animal universal para diversas áreas da pesquisa biológica, incluindo estudos de ecotoxicologia e citotoxicologia, por oferecer diversas vantagens em estudos de processos, efeitos e mecanismos biológicos, e por poder representar aspectos do desenvolvimento de um grupo abrangente de outras espécies, incluindo mamíferos (NILSEN et al., 2004; SEGNER, 2009; HOWE et al., 2013).

Dentre as principais vantagens que fazem o *zebrafish* um excelente modelo animal, estão sua alta similaridade genética (cerca de 71%) com humanos, e algumas características únicas, como manejo simples, manutenção acessível financeiramente, tamanho pequeno, robustez, desova assíncrona, facilidade de mantimento em cultura, embrião transparente, alta fecundidade, ciclo de vida curto e diferentes cepas disponíveis. Além disso, o genoma deste animal é completamente sequenciado e existem muitas informações a respeito de sua biologia, o que facilita identificar anomalias, doenças e respostas ou comportamentos considerados anormais (NILSEN et al., 2004; SEGNER, 2009; HOWE et al., 2013).

O *D. rerio* foi reconhecido como uma espécie geneticamente tratável pela primeira vez nos anos 1980, o que fez com que muitas pesquisas fossem realizadas a fim de se investigar patologias que seriam análogas a doenças humanas, mas suas características também contribuíram muito na compreensão da anatomia, desenvolvimento e biologia dos vertebrados em geral. Assim, seu

uso em estudos genéticos e de desenvolvimento de animais, em toxicologia ambiental, farmacologia e patologia têm sido uma poderosa ferramenta (NORTON e BALLY-CUIF, 2010; ITURRIAGA-VÁSQUEZ et al., 2012; HOWE et al., 2013; BRADFORD et al., 2017; MAGYARY, 2018).

Na ecotoxicologia, o *zebrafish* é muito utilizado como modelo animal, principalmente em estudos que procuram determinar efeitos de xenobióticos, como metais pesados, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos, em processos biológicos envolvidos na sobrevivência, reprodução e crescimento de organismos aquáticos vertebrados. Para isso, são utilizados tanto adultos e juvenis como larvas e ovos (SEGNER, 2009; MARTÍNEZ-SALES et al., 2015; REDELSTEIN et al., 2015; MAGYARY, 2018).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. BIOENSAIOS

Exemplares adultos de *D. rerio*, machos e fêmeas, foram adquiridos de distribuidora certificada (Dispropet Aquarismo), e aclimatados em aquários de vidro (25L e 30L), à 28°C, pH 7,0 e fotoperíodo 14h luz/10h escuro, sob aeração constante, durante 15 dias, no Laboratório de Bioensaios, do Departamento de Biologia Celular, da Universidade Federal do Paraná (Figura 4). Os valores de temperatura, pH e fotoperíodo para aclimação e experimento controle foram estabelecidos de acordo com valores usualmente recomendados pela literatura (REED e JENNINGS, 2011; ALESTRÖM et al., 2020).

FIGURA 4 – AQUÁRIOS DE ACLIMATAÇÃO



FONTE: O autor (2020)

Após o período de aclimação, os peixes foram transferidos para aquários específicos para manutenção dessa espécie, em um sistema (Altamar®) que possui quatro níveis de aquários e um de filtragem. Cada um dos níveis contém 10 aquários (40 aquários no total), contendo água filtrada por osmose reversa, compondo um *rack* de aço inoxidável (167cm x 186cm x 55cm).



Os aquários são na cor azul, feitos de policarbonato, com dimensões de 11,5cm x 34,5cm x 15,5cm e volume de 3,0L, tendo capacidade para 30 peixes cada (total de até 1200 peixes adultos) (Figura 5).

Temperatura, pH e condutividade podem ser controladas e monitoradas em tempo real através de uma central conectada à internet com acesso remoto através de computador, celular ou tablet. O controle de pH é alcançado através de uma solução alcalinizante (30g de bicarbonato de sódio por litro de água ultrapura) e o controle da condutividade é alcançado através de uma solução de correção de condutividade (30g de sal marinho por litro de água ultrapura).

FIGURA 5 – RACK PARA MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ZEBRAFISH



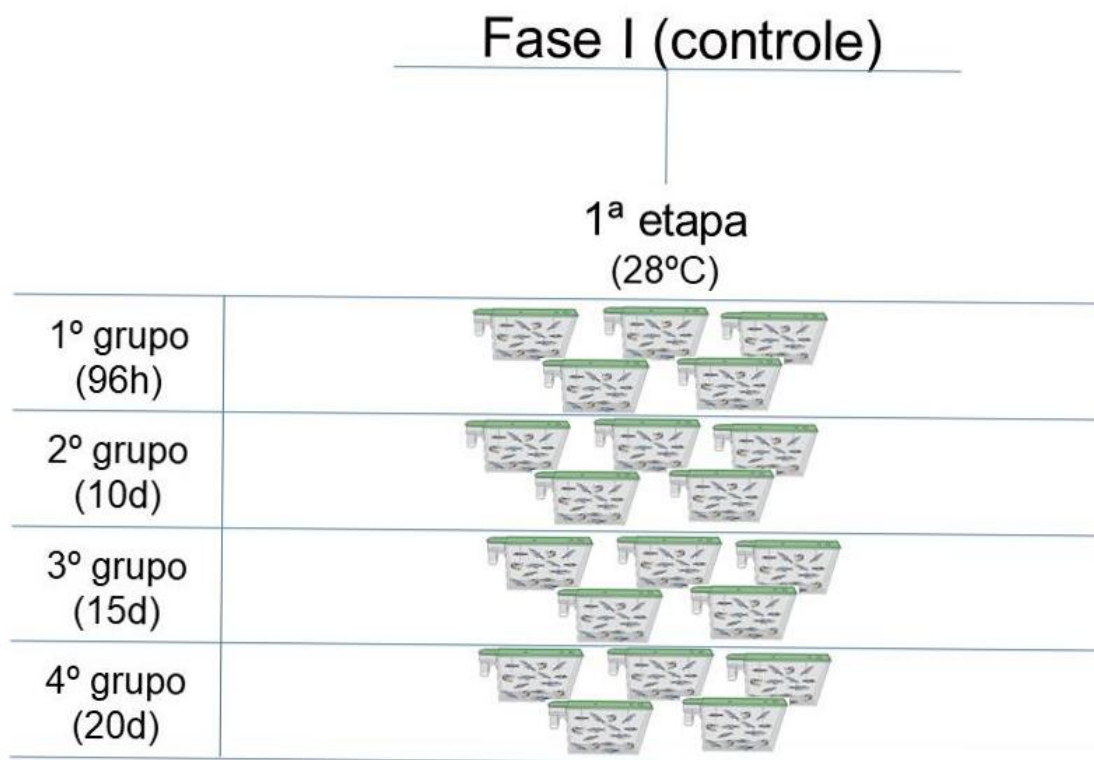
FONTE: O autor (2021).

Além disso, em cada um dos níveis há um registro geral, que permite regular a pressão hídrica em toda a linha, e o fluxo hídrico de cada aquário é regulado através de um registro individual. Há um direcionador de fluxo e acionamento automático diário da luz UV (sistema de descontaminação). O *rack* acompanha caneta para drenagem de resíduos sólidos, um sistema de tratamento de água automático para remoção dos poluentes (filtros químicos com carvão ativado, biológico com mídia fluidizada Siporax® e mecânico com *bags* laváveis) e bomba com motor magnético, que proporciona o fluxo de água entre os níveis e, conseqüentemente, a aeração.

Durante a transferência dos peixes para os aquários do *rack*, após o período de aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, com quintuplicatas (5 aquários), com 15 peixes cada. Após a transferência e aclimação no *rack*, os grupos foram submetidos a condições variadas e controladas de temperatura (25°C, 28°C e 31°C) e pH (5, 7 e 9). O tempo de exposição a essas variações foi de 4 dias, 10 dias, 15 dias e 20 dias, sendo determinado a partir de estudos anteriores que demonstraram resultados satisfatórios em relação à expressão de MT (CHEN et al., 2007) e de VTG (WANG et al., 2016) em *D. rerio*. Para tanto, o experimento foi dividido em três fases, subdivididas em etapas:

- Fase I: Consistiu-se pelo experimento controle, isto é, temperatura de 28°C e pH 7,0 (Figura 6). O controle da temperatura da água foi realizado através dos termostatos que o *rack* dispõe, juntamente com o controle da temperatura ambiente do laboratório, através de aparelho ar condicionado.

FIGURA 6 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PRIMEIRA FASE DOS BIOENSAIOS

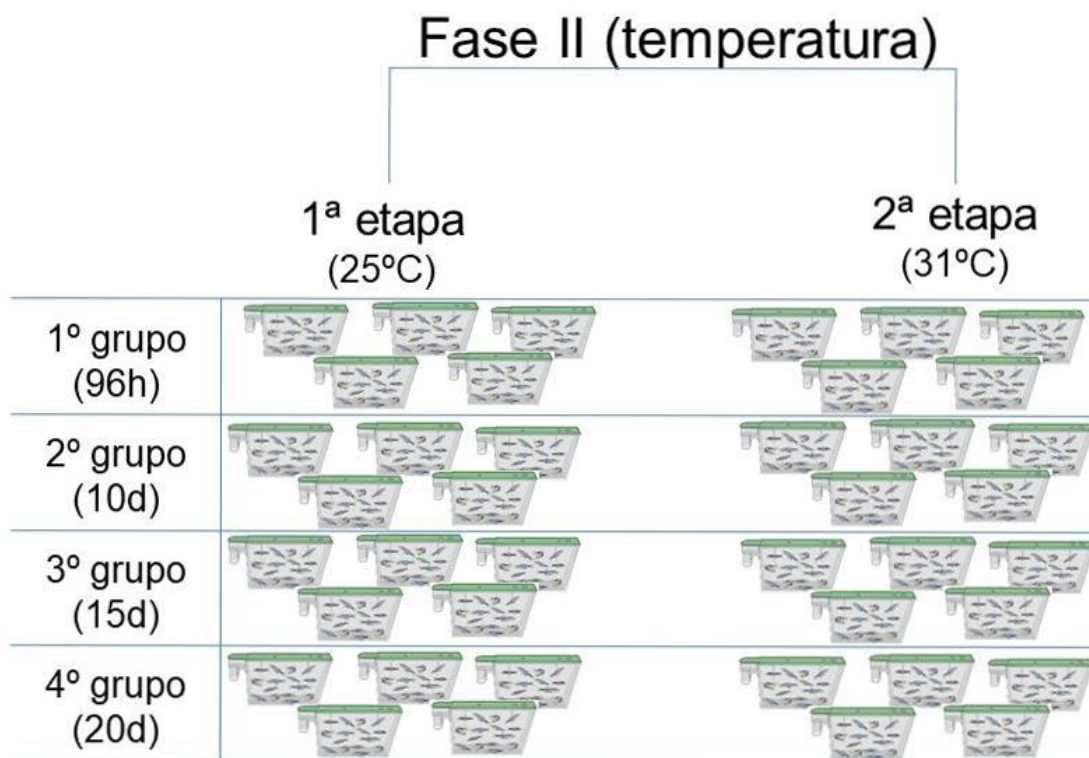


FONTE: O autor (2021).

- Fase II: Consistiu-se pela variação da temperatura. Na primeira etapa, os animais foram submetidos à temperatura de 25°C. E na segunda etapa, a temperatura foi de 31°C. O pH foi 7,0 em todas as etapas desta fase (Figura 7). O controle da temperatura da água foi realizado através dos termostatos que o *rack* dispõe, juntamente com o controle da temperatura ambiente do laboratório, através de aparelho ar condicionado. A temperatura foi elevada ou diminuída em 0,5°C a cada 2 horas, até atingir a faixa desejada, para diminuir o estresse térmico nos animais.



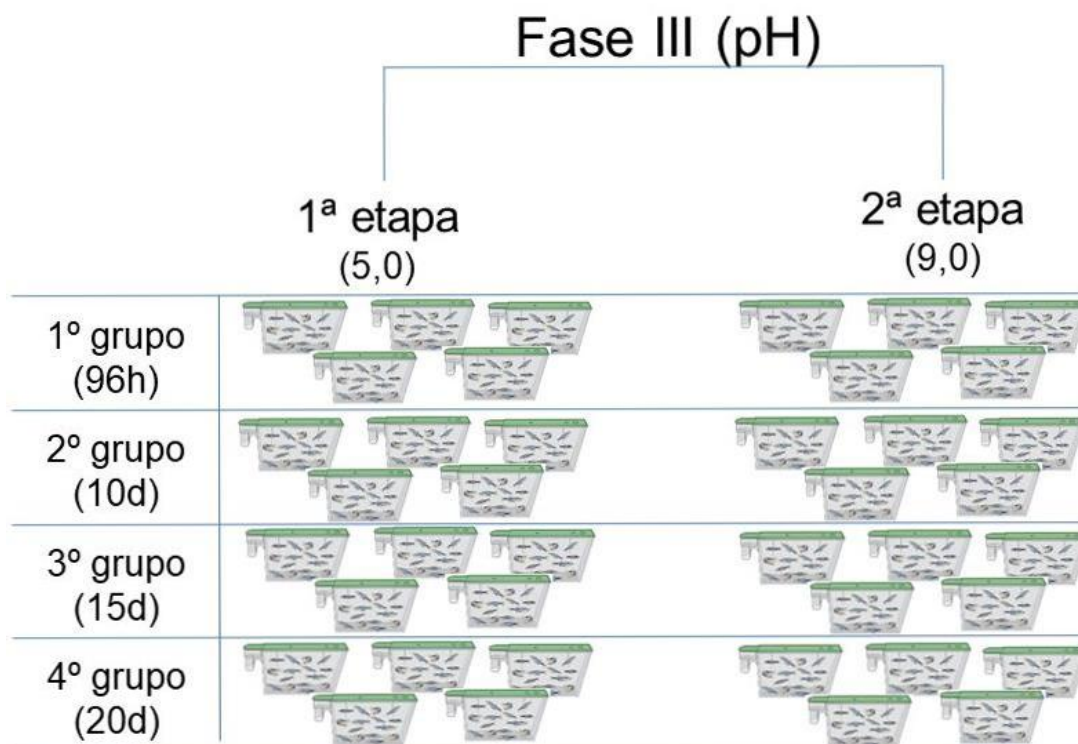
FIGURA 7 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA SEGUNDA FASE DOS BIOENSAIOS



FONTE: O autor (2021).

- Fase III: Consistiu-se pela variação de pH. Na primeira etapa, os animais foram submetidos ao pH 5,0. E na segunda etapa, o pH foi 9,0. A temperatura de 28°C foi constante em todas as etapas desta fase (Figura 8). O pH foi elevado injetando-se solução de Bicarbonato de Sódio na água do sistema de aquários, até atingir a faixa de pH 9,0. Já o pH ácido (pH 5,0) foi atingido através de solução de Ácido Clorídrico (acidificante para corrigir pH da água *Labcon® Acid*). O pH foi elevado ou diminuído em 0,5 ponto até atingir a faixa desejada, para diminuir o estresse fisiológico, principalmente osmorregulatório, nos animais.

FIGURA 8 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA TERCEIRA FASE DOS BIOENSAIOS



FONTE: O autor (2021).

Para ambas as etapas, foram realizados testes pilotos, nos quais 5 peixes foram submetidos às temperaturas e pHs definidos acima, por um período de 5 dias, para se certificar de que os valores de temperatura e pH diferentes dos valores ideais da espécie (temperatura de 28°C e pH 7,0) não induzissem a morte dos animais. Como não houve mortes dos animais nos testes pilotos, os valores estabelecidos foram considerados seguros para utilização nos bioensaios e então os experimentos foram iniciados.

Após os bioensaios, os animais foram eutanasiados com uma overdose de anestésico metanosulfonato de tricáína (250mg/L de MS222 – Ethyl 3-aminobenzoate *Sigma Aldrich™*), submetidos à sexagem e biometria, e armazenados em -80°C. Posteriormente, os animais foram homogeneizados e centrifugados para obter uma fração sobrenadante, sendo metade do número de indivíduos machos e fêmeas do aquário utilizados para avaliação da concentração de MT e VTG através de ELISA sanduíche, e a outra metade para avaliação da expressão gênica dessas duas proteínas, através de rt-qPCR.

Cabe salientar, que todos os experimentos e procedimentos foram previamente submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de

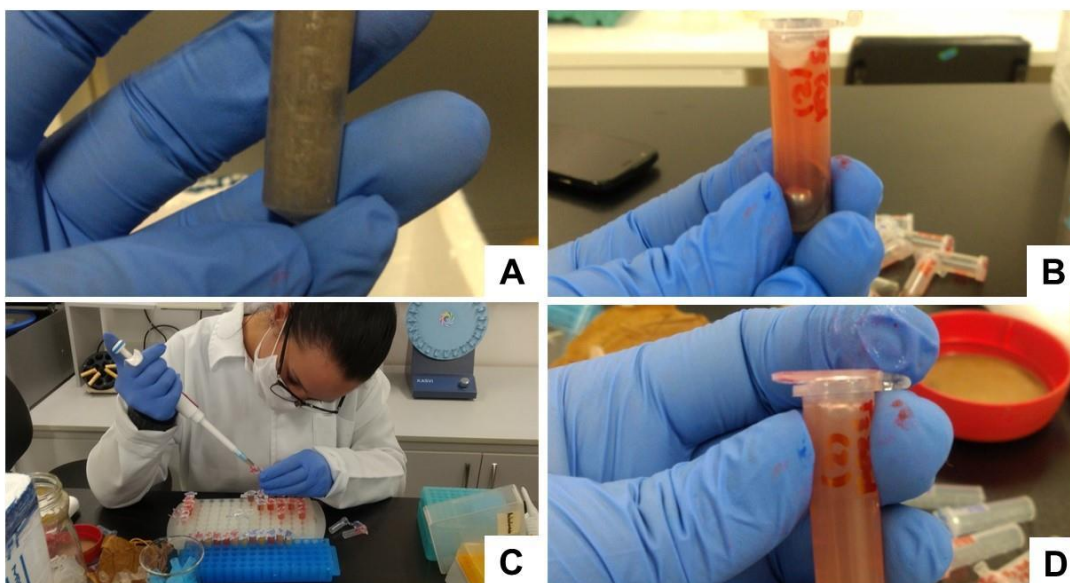
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), sendo aprovados por este órgão, sob protocolo número 23075.075523/2018-79 (Anexo 1).

### 3.2. AVALIAÇÃO PROTEICA PELO MÉTODO DE ELISA SANDUÍCHE

#### 3.2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OS ENSAIOS DE ELISA

Machos e fêmeas, individualizados, foram homogeneizados em tampão de homogeneização (50mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 0,5% NP-40; 1% Triton X-100; 10mM beta-mercaptoetanol; 1mM PMSF), numa proporção de, aproximadamente, 1:4 (peso : volume), durante nove minutos, a 250 rpm, em homogenizador de tecidos (*TissueLyser II*, Qiagen<sup>TM</sup>). A clarificação do homogenato foi realizada através de centrifugação a 14000g, durante 5 min, a 4°C, e o sobrenadante foi recuperado e mantido a -80°C até a realização dos ensaios (modificado e adaptado de NILSEN et al., 2004).

FIGURA 9 – COLETA DOS HOMOGENATOS PARA ELISA



FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Após a homogeneização dos organismos (A), os homogenatos foram centrifugados (B) e a fração sobrenadante foi coletada para as análises de ELISA (C e D). Essas amostras foram armazenadas a -80°C até a realização do teste de ELISA sanduíche.

### 3.2.2. PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ELISA QUANTITATIVO

Após os bioensaios e homogenizações, foram realizadas tentativas de padronização de protocolos para os testes de ELISA sanduíche, utilizados para avaliar as concentrações de VTG e de MT nas amostras coletadas nos bioensaios.

Nestas tentativas, foram testadas diferentes variáveis e concentrações das biomoléculas para encontrar as condições ideais a fim de determinar as condições mais adequadas para detectar o mínimo das moléculas alvo (MT e VTG) e elaborar um protocolo final do teste de ELISA.

Nos ensaios de ELISA sanduíche para detecção de MT, realizado conforme o protocolo do apêndice 1, diferentes concentrações do anti-MTR purificado (0,5; 0,8; e 1,0 µg/mL) foram imobilizadas em placas de ELISA (*Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific*) a fim de determinar a concentração mais adequada para detectar o mínimo da molécula alvo. Nestes ensaios foram avaliadas também diferentes diluições do extrato total do animal (amostra concentrada; 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; e 1:20), do anticorpo policlonal anti-MTR conjugado com biotina (0,5; 1,0; 2,5; e 5,0 µg/mL) e da estreptavidina conjugada com a enzima peroxidase (1:10000; 1:15000; 1:20000; e 1:30000).

Foi realizado o mesmo para os ensaios de ELISA sanduíche para detecção de VTG, realizado conforme o protocolo do apêndice 2, testando diferentes concentrações do anti-VTGR purificado (0,1; e 0,2 µg/mL) imobilizadas em placas de ELISA (*Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific*), além de diferentes diluições do extrato total do animal (1:1; 1:5; 1:20; e 1:50), do anticorpo policlonal anti-VTGR conjugado com biotina (0,2; e 1,0 µg/mL) e da estreptavidina conjugada com a enzima peroxidase (1:10000; 1:20000; e 1:30000).

Outras diferentes biomoléculas, variáveis e concentrações testadas, e as considerações sobre esses testes, são apresentadas na Tabela 2, na sessão Resultados.

Para determinar a concentração de uma determinada molécula numa amostra biológica através do ensaio de ELISA, é realizado uma curva padrão, utilizando uma proteína de massa conhecida em diferentes diluições. Para este ensaio foi utilizado as proteínas MT recombinante (obtida na bactéria *Escherichia coli*; purificada por cromatografia de afinidade e troca iônica; concentração estoque de 190µg/mL) e VTG nativa de *Oreochromis niloticus* (concentração estoque de 480µg/mL), cujas massas foram estimadas por meio da absorbância obtida em espectrofotômetro (*NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific*) e por SDS-PAGE frente à comparação visual com uma curva padrão da proteína BSA, sob diferentes diluições. Este ensaio foi realizado conforme o protocolo do apêndice 1 e 2, sendo neste caso, imobilizado 0,5µg/mL do anticorpo policlonal anti-MTR e 0,2µg/mL do anticorpo policlonal anti-VTGR nas microplacas de 96 poços.

A curva padrão foi realizada a partir de diluições seriadas das proteínas (0,03; 0,015; 0,0075; e 0,0 mg/mL de VTG, e 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,001563; e 0,0 mg/mL de MT), em tampão de diluição (PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA), em triplicata. Os valores obtidos através da leitura da absorbância do ensaio, gerado pela adição do substrato ao ensaio, foram inseridos no programa Excel 2016, para gerar as curvas e equações da reta.

### 3.2.3. ENSAIOS DE ELISA SANDUÍCHE QUANTITATIVO

Os protocolos de ELISA sanduíche padronizados são apresentados, na íntegra, nos Apêndices 1 e 2, de acordo com as melhores condições identificadas. Os protocolos estabelecidos foram aplicados às amostras de extrato total de *D. rerio* submetidas aos diferentes tratamentos e tempos dos bioensaios.

Para os ensaios, foram utilizados anticorpos (obtidos em coelho) produzidos pelo Grupo de Toxicologia Celular/UFPR através de técnicas de hibridização *in vitro*. Os anticorpos anti-MTR e anti-VTGR foram produzidos e previamente caracterizados pelo grupo (NAGAMATSU et al., 2020; FOLLE, 2018).

Para a detecção de VTG nos espécimes de *D. rerio*, os anticorpos policlonais de captura anti-VTGR (anti vitelogenina recombinante) foram

adsorvidos, numa concentração de 0,2µg/mL (diluídos em tampão de sensibilização carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6), sobre a superfície de microplacas de 96 poços (*Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific*), por 17 horas a 4°C. Após lavagens dos poços já sensibilizados, com PBS-T (PBS 1x acrescido de 0,05 % de Tween-20), e bloqueio com albumina de soro bovino (BSA 3% em PBS 1x) por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados com PBS-T, e as amostras foram adicionadas à microplaca, a qual foi então incubada à 37°C por uma hora. O homogenato foi previamente centrifugado em 3000rpm, por 10min, à 4°C, para remover agregados, e então diluído 1:1 em tampão de diluição (PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA). Proteínas não ligadas foram removidas por meio de lavagens com PBS-T, e os anticorpos policlonais de detecção, anti-VTGR, previamente biotinilados, e diluídos em tampão de diluição, foram adicionados, na concentração de 1 µg/mL. Após incubação por uma hora, a 37°C, os anticorpos biotinilados não ligados foram removidos por meio de lavagens com PBS-T. Para revelação, foi utilizado um conjugado de streptavidina com peroxidase (SA-HRP), diluído 1:10000 em tampão diluente (incubação de uma hora, em temperatura ambiente), e o substrato 3,3',5,5 – tetrametilbenzidina (TBM; Scienco™ OneStepTMB) (incubação de 20 minutos, em temperatura ambiente e ausência de luminosidade).

Para a detecção de MT nos espécimes de *D. rerio*, os anticorpos policlonais de captura anti-MTR (anti metalotioneína recombinante) foram adsorvidos, numa concentração de 0,5µg/mL (diluídos em tampão de sensibilização carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6), sobre a superfície de microplacas de 96 poços (*Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific*), por 20 horas, a 4°C. Após lavagens dos poços já sensibilizados, com PBS-T (PBS 1x acrescido de 0,05 % de Tween-20), e bloqueio com albumina de soro bovino (BSA 3% em PBS 1x) por duas horas em temperatura ambiente, os poços foram novamente lavados com PBS-T, e as amostras foram adicionadas à microplaca, a qual foi incubada por uma hora à 37°C. O homogenato foi centrifugado em 3000rpm, por 10min, à 4°C, para remover agregados, e então diluído em 20x em tampão de diluição (PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA). Proteínas não ligadas foram removidas por meio de lavagens com PBS-T, e os anticorpos policlonais de detecção, anti-MT,

previamente biotinilados, e diluídos em tampão de diluição, foram adicionados, na concentração de 2,5 µg/mL. Após incubação por uma hora a 37°C, os anticorpos biotinilados não ligados foram removidos por meio de lavagens com PBS-T. Para revelação, foi utilizado um conjugado de streptavidina com peroxidase (SA-HRP), diluído 1:30000 em tampão diluente (incubação de uma hora em temperatura ambiente), e o substrato 3,3',5,5 – tetrametilbenzidina (TBM; Scienco™ OneStepTMB) (incubação de 30 minutos, em temperatura ambiente e ausência de luminosidade).

A absorbância das amostras foi determinada em aparelho espectrofotômetro leitor de placas (*Varioskan™ LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific*), a 450nm. A quantificação das proteínas foi realizada por meio de comparação com a curva padrão de cada placa, feita com diluição seriada de concentrações conhecidas de VTG purificada de *O. niloticus* (0,03; 0,015; 0,0075; e 0,0 mg/mL) e MT recombinante (0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,001563; e 0,0 mg/mL), em tampão de diluição (PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA), cujas massas foram estimadas por meio da absorbância obtida em espectrofotômetro (*NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific*) e por SDS-PAGE frente à comparação visual com uma curva padrão da proteína BSA, sob diferentes diluições. O branco das placas foi realizado através de ausência de amostra.

### 3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA PELA TÉCNICA DE rt-qPCR

A análise da expressão gênica foi realizada pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em tempo real por transcrição reversa (rt-qPCR), estabelecendo comparações nos níveis de expressão entre os diferentes tratamentos.

Para avaliação de expressão gênica, foram utilizados apenas animais do último tempo de exposição aos tratamentos (20 dias). A extração do RNA total das amostras de *D. rerio* submetidas aos tratamentos foi efetuada através de lise química com *TRIzol™ Reagent (Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific)*, combinada com o *PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific)*, seguido do uso do *SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific)* para conversão do RNA em cDNA,

conforme recomendações do fabricante. As reações de conversão foram realizadas em termociclador convencional (*Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems™ – Thermo Fisher Scientific*). O RNA e o cDNA totais foram quantificados em espectrofotômetro (*NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific*), e seu grau de pureza foi verificado a 260/280nm. Géis de agarose (1%) foram confeccionados para fins de verificação da qualidade do RNA extraído.

Os *primers* utilizados para análise da expressão gênica de vitelogenina (VTG) e de metalotioneína (MT), incluindo os *primers* de genes de controle endógeno, ou *housekeeping*, fator de elongação 1 $\alpha$  (EF),  $\beta$ -actina (BACT) e membro 5 da família de transportadores de soluto 25 $\alpha$  (SLC) foram desenhados baseados em sequências depositadas no *GenBank*, utilizando os softwares *ClustalW*, *Generunner* e *Primer 3*, confirmada sua especificidade por *BLASTx*, e suas sequências são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1 – SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS

Gene	Sequência
Vitelogenina	Forward 5' GGTATCCTCAACATCCTTCAGC 3'
	Reverse 5' CTTTGGATCCTCATTGATGACA 3'
Metalotioneína	Forward 5' GCCAAGACTGGAACCTTGCAAC 3'
	Reverse 5' CGCAGCCAGAGGCACACT 3'
B-actina	Forward 5' ACTTCACGCCGACTCAAAC 3'
	Reverse 5' GTCACCTTCACCGTTCCAGT 3'
Fator de Elongação 1 $\alpha$	Forward 5' CTGACCCACCCTGGTCAGAT 3'
	Reverse 5' CGGTCGATCTTCTCCTTGAG 3'
Membro 5 da família de transportadores de soluto 25 $\alpha$	Forward 5' TTCGGCATTATGACACAGC 3'
	Reverse 5' ACCAGCAACAGCAGTCACAC 3'

FONTE: O autor (2021).

### 3.3.1. TESTES EM PCR CONVENCIONAL

Para validação dos *primers* e otimização da temperatura ótima de anelamento dos mesmos, foram realizados testes de PCR convencional, em termociclador convencional (*Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems™ – Thermo Fisher Scientific*), nas temperaturas de anelamento de



58, 60 e 62°C para cada *primer*, testando o uso de SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>TM</sup> – Thermo Fisher Scientific), e de Mix para PCR convencional.

O protocolo adotado para análise dos *amplicons* está mostrado no Apêndice 3; foi utilizado 2 µl de cDNA (50ng/µL), 6,6 µL de Mix para PCR convencional, 2 µl de *primer forward* (2µM); 2 µl de *primer reverse* (2µM), e 7,4 µl de água ultrapura autoclavada. A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, temperaturas de anelamento testadas (58, 60 e 62°C) por 15 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; seguido de 72°C por 5 minutos.

Os *amplicons* foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose. Este procedimento é realizado para se certificar em que temperatura de anelamento os *primers* melhor funcionam, ou seja, são mais específicos ao fragmento de interesse, uma vez que a padronização deficiente da temperatura de anelamento dos *primers* ao cDNA alvo pode levar à inespecificidade da rt-qPCR. Para isso, 20µL do produto de reação de PCR convencional foi aplicado em geis de agarose de 1,0 a 2,0% (concentrações recomendadas pelo fabricante do marcador molecular, *Ladder* 100pb – Ludwig Biotecnologia Ltda), já polimerizados, e as corridas foram realizadas a 70V, por 35 minutos. As bandas foram visualizadas sob luz UV, em aparelho fotodocumentador.

### 3.3.2. TESTES DE OTIMIZAÇÃO DA rt-qPCR

Para a otimização da rt-qPCR, foram realizados testes com diferentes concentrações de cDNA (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ng/µL), formando uma curva, para cada *primer*, para verificar a concentração ótima de cDNA que poderia ser utilizada nos testes finais, através de PCR em tempo real, utilizando SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>TM</sup> – Thermo Fisher Scientific) (1x), 0,2 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), e a temperatura antes padronizada nos testes de anelamento de *primers* (60°C). Este procedimento é realizado para se certificar que a qPCR exhibe alta eficiência e que os *primers* estão específicos, uma vez que a padronização deficiente da concentração de cDNA e da curva de *melting* pode levar à ineficiência e inespecificidade da rt-qPCR. Para tanto, foram avaliados os valores de *slope*, eficiência e  $r^2$  de cada *primer* em relação a cada

concentração testada. Nestes mesmos testes, também foram avaliadas as curvas de *melting* de cada um dos *primers* utilizados. Foram realizados ainda testes adicionais, com diferentes concentrações de *primer* (0,1; 0,2; 0,3; e 0,4  $\mu$ M) para os *primers* que apresentaram curvas de *melting* insatisfatórias e, assim, melhorar sua eficiência na qPCR.

### 3.3.3. ENSAIOS DE rt-qPCR

Após a padronização e otimização da técnica de rt-qPCR com os *primers* utilizados, sabendo a temperatura ideal de anelamento dos *primers* (60°C), a concentração ótima de cDNA (100 ng), a concentração ótima de cada *primer* (0,2  $\mu$ M para MT, EF e SLC; e 0,4  $\mu$ M para VTG), e quais os genes endógenos que se comportam como ambos os genes de interesse e que, portanto, aos quais os genes de interesse podem ser devidamente comparados (EF e SLC), foi realizada a análise da expressão gênica de VTG e MT dos espécimes de *zebrafish* submetidos aos bioensaios, utilizando *SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems<sup>TM</sup> – Thermo Fisher Scientific), em termociclador para PCR em tempo real (*StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR System*, Applied Biosystems<sup>TM</sup> – Thermo Fisher Scientific, contendo o *software StepOne<sup>TM</sup>* versão 2.3) conforme protocolo apresentado no Apêndice 4. O protocolo estabelecido foi aplicado às amostras de extrato total de *D. rerio* submetidas aos diferentes tratamentos, no tempo de 20 dias, dos bioensaios.

### 3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Os resultados das análises de quantificação proteica por ELISA e de expressão gênica por rt-qPCR foram analisados estatisticamente através de análises não paramétricas, utilizando o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn, para determinar se ocorreram interferências significativas dos fatores físicos e químicos na expressão de VTG e MT dos animais submetidos às diferentes condições dos bioensaios.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE ELISA PARA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH*

Para obtenção de um desempenho máximo da molécula alvo a ser analisada, os ensaios de ELISA requerem ajustes e otimização em cada etapa e moléculas a serem utilizadas. Normalmente é realizada uma curva contendo várias concentrações da molécula a ser imobilizada nas microplacas (molécula de captura). E ainda, devem ser testadas diferentes diluições da amostra a ser analisada.

O grupo de pesquisa em Toxicologia Celular da UFPR ainda não contava com um protocolo padronizado de ELISA para amostras biológicas de *D. rerio*. Além disso, a escassez de ensaios na literatura similares aos executados durante este mestrado, gerou a necessidade de realizar diversos testes a fim de se padronizar um ensaio que permitisse a quantificação de MT e VTG em espécimes adultos de *zebrafish*.

Além disso, o fato de não haver VTG comercial purificada de *D. rerio*, e nem MT comercial purificada de peixes, acabou dificultando extremamente as análises deste trabalho. A variabilidade da VTG, e o uso de anticorpos anti-MT recombinante (obtidos em bactérias e, portanto, sem modificações pós-traducionais) acabou complicando os ensaios.

Como o propósito do grupo vem sendo desenvolver biomoléculas para a detecção de biomarcadores de contaminação aquática, e também pela escassez de biomoléculas específicas (isto é, anticorpos e proteínas comerciais para *D. rerio*) e falta de recursos, acabou-se por optar apenas pelas biomoléculas produzidas pelo grupo. Todas as biomoléculas utilizadas neste ensaio já foram caracterizadas e validadas em trabalhos anteriores e têm qualidade satisfatória para a realização dos ensaios. Biomoléculas específicas já estão sendo desenvolvidas pelo laboratório para contornar tais problemas.

Assim, nas tentativas de padronização dos protocolos de ELISA sanduíche para avaliação quantitativa de MT e VTG em *D. rerio*, foram testados diferentes variáveis, tampões e biomoléculas, e em diferentes concentrações e

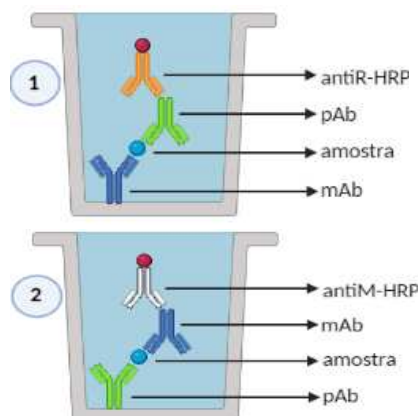
condições, que estão apresentadas, juntamente com os resultados dessas tentativas, na Tabela 2.

TABELA 2 – VARIÁVEIS E CONDIÇÕES TESTADAS NA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE ELISA SANDUÍCHE

Variáveis Testadas	Condições	Considerações
Anticorpos de captura para MT	mAb anti-MTC 0,5, 1,5, 2,0 e 8,0 e 10µg/mL; pAb anti-MTR 0,5, 1,0 e 0,8µg/mL	A melhor condição encontrada foi com o anti-MTR na concentração de 0,5µg/mL
Anticorpos de captura para VTG	pAb anti-VTG 0,5, 1,5, 2,0, 8,0 e 10 µg/mL; pAb anti-VTGR 0,2µg/mL	A melhor condição encontrada foi com o anti-VTGR na concentração de 0,2µg/mL
pH para sensibilização	pH 7,4 (tampão PBS); pH 9,6 (tampão carbonato-bicarbonato)	Sem diferenças entre as condições
Tampão de Bloqueio	PBS-T 0,1% com BSA 2%; leite 5%; leite diluído 1:1 em TBS-T 0,025%; PBS acrescido de 1% de BSA; PBS-T 0,1% acrescido de 1% BSA; BSA 3% em PBS	Sem diferenças entre as condições
Amostras (extrato total <i>D. rerio</i> )	Para MT, amostra concentrada, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20; para VTG, amostra 1:1, 1:5, 1:20 e 1:50	A melhor diluição para as amostras de <i>D. rerio</i> foi a de 1:20 vezes para detecção de MT e de 1:1 para detecção de VTG
Anticorpos primários anti-MT	Soro pAb anti-MTR 1:200 e 1:2000; pAb anti-MTC 0,5µg/mL, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000; mAb anti-MTC 5µg/mL	Em todas as condições testadas, os poços contendo amostra não emitiram absorbâncias diferentes dos poços correspondentes sem amostra ( * )
Anticorpos primários anti-VTG	Soro pAB anti-VTG 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000	Em todas as condições testadas, os poços contendo amostra não emitiram absorbâncias diferentes dos poços correspondentes sem amostra ( * )
Anticorpos conjugados com fosfatase alcalina	antiR-AP 1:2000 e 1:4000	Em todas as condições testadas, os poços contendo amostra não emitiram absorbâncias diferentes dos poços correspondentes sem amostra ( * )
Anticorpos conjugados com peroxidase	antiR-HRP 1:3000, 1:5000, 1:10000 e 1:20000; antiM-HRP 1:500 e 1:3000	Em todas as condições testadas, os poços contendo amostra não emitiram absorbâncias diferentes dos

		poços correspondentes sem amostra ( * )
Anticorpos conjugados com biotina	anti-MT-B 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0µg/mL; anti-VTGR-B 0,2 e 1µg/mL	A melhor concentração foi de 2,5 µg/mL para anti-MT-B e de 1 µg/mL para anti-VTGR-B
Estreptavidina conjugada com peroxidase para MT	1:10000, 1:15000, 1:20000 e 1:30000	melhor resultado na diluição de 1:30000
Estreptavidina conjugada com peroxidase para VTG	1:10000, 1:20000 e 1:30000	melhor resultado na diluição de 1:10000
Tampão de Lavagem	PBS acrescido de 0,1% de tween-20 e 2% de BSA; TBS acrescido de 0,1% de Tween-20 – TBS-T; TBS acrescido de 0,02% de Tween-20 – TBS-T; PBS acrescido de 0,05% de Tween-20 – PBS-T; PBS acrescido de 0,05% de Tween-20 – PBS-T	Sem diferenças entre as condições
Reação do TBS com TMB	Presença apenas de TBS e TMB	O substrato TMB não é reativo na presença de TBS
Reação do TBS-T com TMB	Presença apenas de TBS-T e TMB	O substrato TMB não é reativo na presença de TBS-T
Reação do PBS com TMB	Presença apenas de PBS e TMB	O substrato TMB não é reativo na presença de PBS
Reação do PBS-T com TMB	Presença apenas de PBS-T e TMB	O substrato TMB não é reativo na presença de PBS-T
Reação do anti-metalotioneína com TMB	Presença apenas de anti-MT e TMB	O substrato TMB não é reativo na presença de anti-MT
Reação do anti-vitelogenina com TMB	Presença apenas de anti-VTG e TMB	O substrato TMB não é reativo na presença de anti-VTG
Reação do leite + Tween-20 (tampão de bloqueio) com TMB	Leite com 0,5%, 1,0%, 2,0% e 4,0% de Tween-20 e TMB	2,0% e 4,0% de tween-20 apresentaram valores de absorbância acima do background tolerável; 0,5% e 1,0% de Tween-20 foram abaixo do background máximo tolerável, sendo, portanto, mais recomendados
Reação do BSA (tampão de bloqueio) + Tween-20 com TMB	BSA com 0,5%, 1,0%, 2,0% e 4,0% de Tween-20 e TMB	2,0% e 4,0% de tween-20 apresentaram valores de absorbância acima do background tolerável; 0,5% e 1,0% de Tween-20 foram abaixo do Background máximo tolerável, sendo, portanto, mais recomendados

Reação dos anticorpos conjugados com HRP, diluídos em TBS, com TMB	1:500, 1:1000, 1:5000 e 1:25000 e TBM	Maiores concentrações do conjugado devem ser evitadas (absorbância bem próxima do background máximo aceitável)
Reação dos anticorpos conjugados com HRP, diluídos em TBS-T, com TMB	1:500, 1:1000, 1:5000 e 1:25000 e TBM	O Tween-20 é bom componente de diluição nas maiores diluições do conjugado, porém, em diluições menores do conjugado, ele deve ser evitado (pois aumenta a absorbância, mesmo em ausência de amostra)
Reação do TMB com a placa	Somente TMB na placa	O TBM não reage com a placa
Tipo/Marca de Placa	THERMO NUNC™ x GREINER™ (ELISA de captura)	Ambas estão em condições de uso e apresentam resultados semelhantes
Arranjo 1 x Arranjo 2		Sem diferenças entre as condições



FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Os campos marcados com asterisco (\*) representam dados não conclusivos; mAb = anticorpo monoclonal; pAb = anticorpo policlonal; MT = metalotioneína; MTC = metalotioneína comercial; MTR = metalotioneína recombinante; VTG = vitelogenina; VTGR = vitelogenina recombinante; PBS = tampão fosfato salino; TBS = tampão tris salino; PBS-T = PBS com adição do detergente Tween-20; TBS-T = TBS com adição do detergente Tween-20; BSA = albumina sérica bovina; antiR-HRP = anti coelho (rabbit) conjugado com peroxidase; antiM-HRP = anti camundongo (mouse) conjugado com peroxidase; TMB = 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (substrato de reação da HRP); HRP = peroxidase de rábano (horseradish peroxidase).

As condições definidas para os ensaios de ELISA foram determinadas conforme os resultados obtidos nesses testes. Foi possível verificar que, em relação à VTG, as diluições de 2 µg/mL do anticorpo de captura anti-VTGR, de 1:1 do homogenato, de 1 µg/mL do anticorpo anti-VTGR biotilado e de 1:10000 do conjugado estreptavidina-HRP, foram as condições capazes de gerar um valor de absorbância maior que as outras concentrações e biomoléculas

testadas. Já para a MT, as diluições de 0,5µg/mL do anticorpo de captura anti-MTR, de 1:20 do homogenato, de 2,5µg/mL do anticorpo anti-MTR biotinilado e de 1:30000 do conjugado estreptavidina-HRP foram as condições que emitiram absorbâncias maiores. Com isso, essas concentrações foram determinadas como padrão para os testes de ELISA quantitativo (Apêndices 1 e 2).

Uma vez determinados os parâmetros iniciais para os ensaios de ELISA sanduíche, estes dados foram utilizados para determinação da curva padrão, a partir das proteínas MT recombinante (obtida na bactéria *E. coli*, purificada por cromatografia de afinidade e troca iônica; concentração estoque de 190µg/mL) e VTG nativa (de *O. niloticus*; concentração estoque de 480µg/mL), previamente quantificadas por espectrofotometria, para detecção e quantificação da MT e VTG nativas de *zebrafish* no extrato total dos animais mantidos sob as diferentes condições experimentais.

Assim, diferentes concentrações de cada proteína (0,03; 0,015; 0,0075; e 0,0 mg/mL de VTG, e 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,001563; e 0,0 mg/mL de MT) foram detectadas por ELISA sanduíche, utilizando as condições previamente determinadas. A análise dos valores da absorbância destes ensaios, realizados em triplicata, no programa Excel 2016, geraram curvas lineares e equações da reta com  $R^2$  maiores que 0,86, valor este que está dentro do aceitável para quantificação de uma determinada molécula por meio do ensaio de ELISA.

Como as absorbâncias das amostras do extrato total de *zebrafish* nos ensaios para detecção de MT se encontravam muito baixas em relação às absorbâncias da curva, foi ainda realizado um ensaio ELISA sanduíche direto para testar diferentes tratamentos das amostras, que pudessem aumentar a afinidade do anticorpo com a MT das amostras: aquecimento das amostras a 70°C, por 20 minutos, e desnaturação proteica com tampão desnaturante (6M de ureia, 2M de thiourea, 2µM de EDTA, 5µM de DTT, 20µM de Tris-HCl pH 8,0). Entretanto, nenhuma diferença foi identificada entre os diferentes tratamentos e entre estes e a amostra sem tratamento.

Também foram realizados testes de ELISA competitivo e ELISA de captura para quantificação de MT nos animais. No ensaio de ELISA competitivo, foram testados MT comercial a 10µg/mL para sensibilização, amostras diluídas 1:1, 1:5 e 1:10, anticorpo biotinilado a 1,0µg/mL, e estreptavidina conjugada a

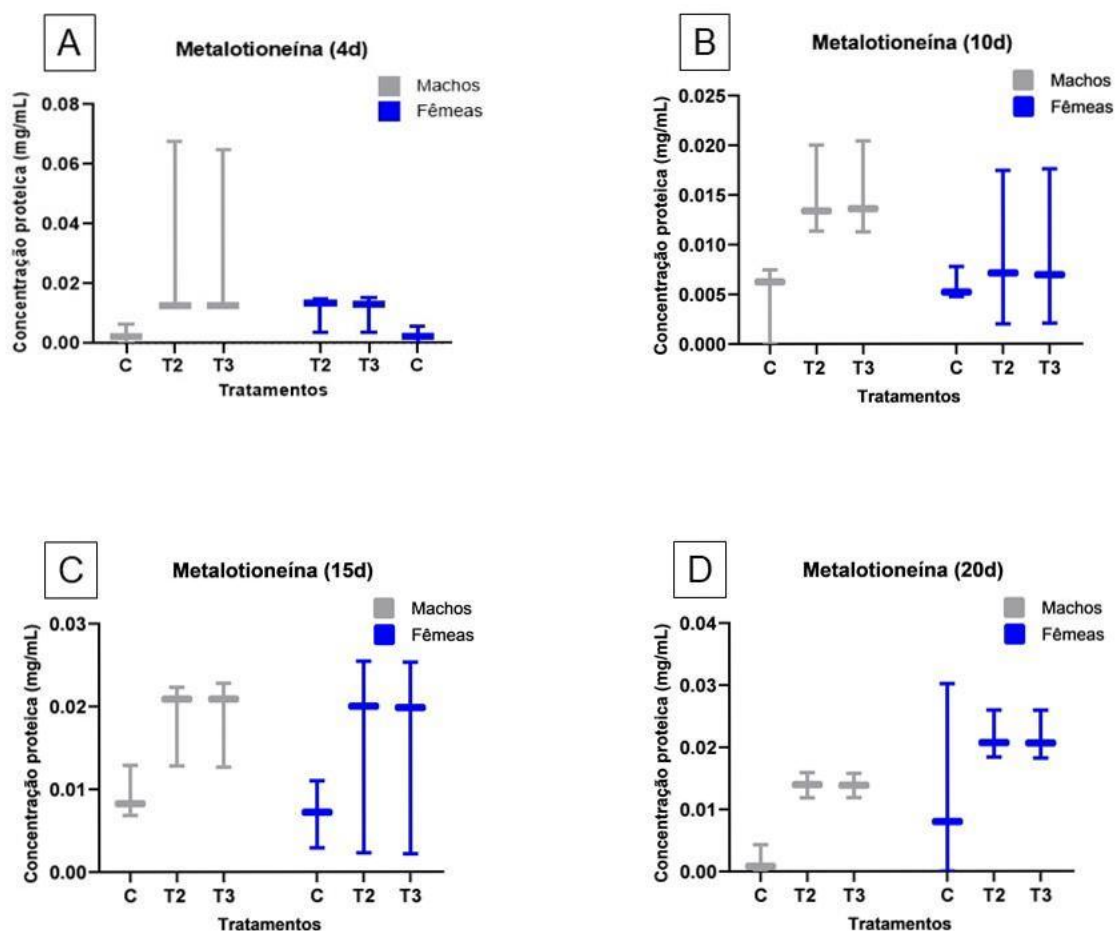
HRP (1:20000). No ensaio de ELISA de captura, as amostras foram normalizadas a 1mg/mL, o anticorpo biotinilado foi testado nas concentrações de 2µg/mL e 1µg/mL, e a estreptavidina conjugada a HRP foi testada nas concentrações de 1:20000 e 1:10000. Esses ensaios não tiveram poder de detecção maiores que o ELISA sanduíche.

#### 4.2. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE METALOTIONEÍNA EM *ZEBRAFISH* PELO ENSAIO DE ELISA

Os resultados da concentração de MT nos grupos expostos às diferentes temperaturas podem ser visualizados nos gráficos apresentados na Figura 10. Não houve diferenças significativas nos diferentes tratamentos em relação ao controle, e nem entre machos e fêmeas de mesmo tratamento, nos diferentes tempos de exposição.



FIGURA 10 – CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM ZEBRAFISH SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

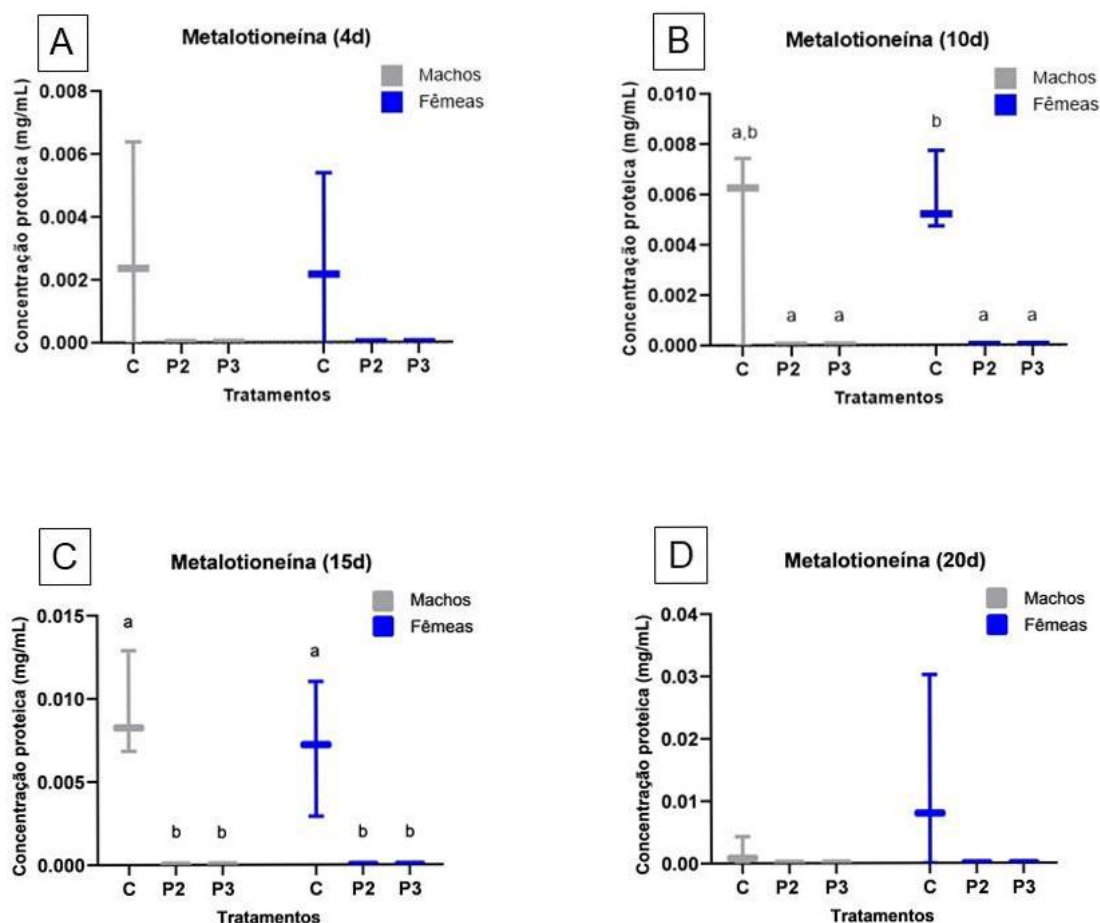


FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Comparação das medianas (com mínimo e máximo) das concentrações de metalotioneína (mg/mL) em *zebrafish* machos e fêmeas submetidos às diferentes temperaturas, por 4 dias (A), 10 dias (B), 15 dias (C) e 20 dias (D). C = controle (28°C); T2 = 31°C; T3 = 25°C. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os resultados da concentração de MT nos grupos expostos aos diferentes pHs podem ser visualizados nos gráficos apresentados na Figura 11. Não houve diferenças significativas dos diferentes tratamentos em relação ao controle, e nem entre machos e fêmeas de mesmo tratamento, nos tempos de exposição de 4 dias e 20 dias. No entanto, no tempo de exposição de 10 dias, animais (machos e fêmeas) submetidos a pH 9,0 e 5,0 apresentaram diferença significativa em relação ao controle composto por organismos fêmeas. E no tempo de exposição de 15 dias, machos e fêmeas submetidos a pH 9,0 e 5,0 apresentaram diferença significativa em relação a seus respectivos controles.

FIGURA 11 – CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM *ZEBRAFISH* SUBMETIDOS A DIFERENTES pHs



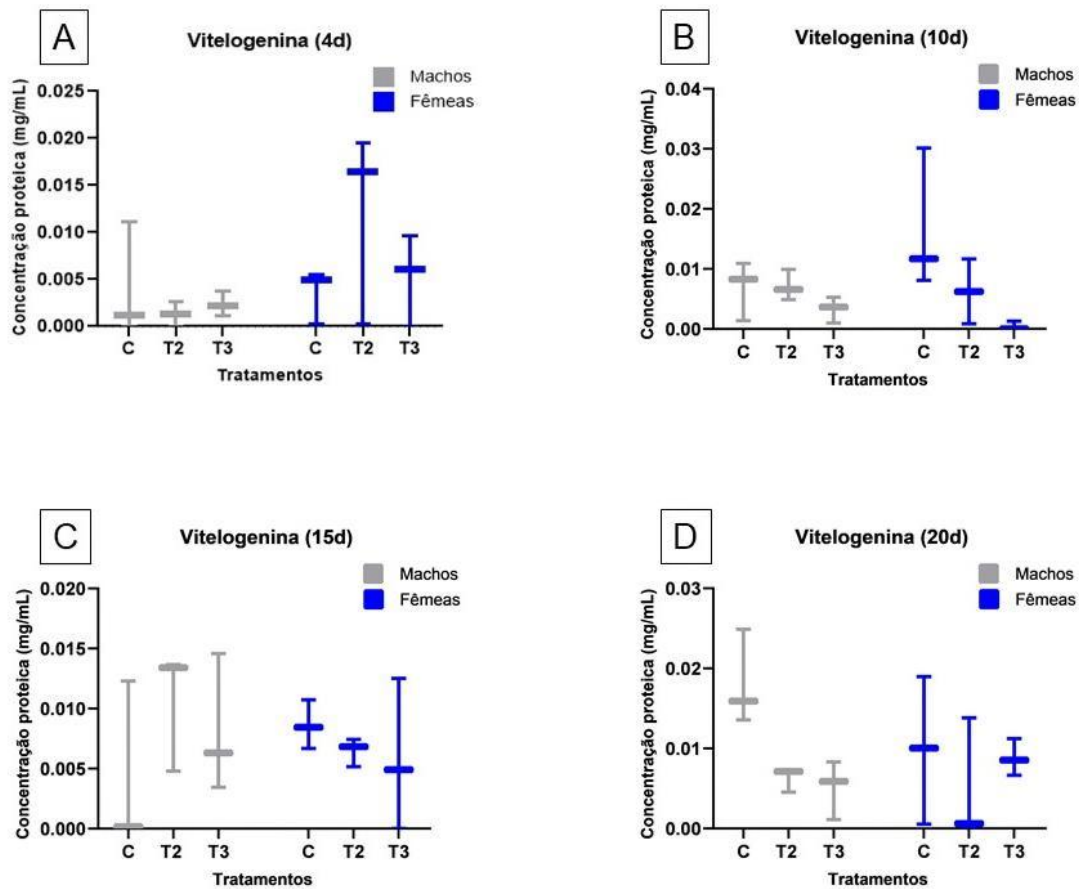
FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Comparação das medianas (com mínimo e máximo) das concentrações de metalotioneína (mg/mL) em *zebrafish* machos e fêmeas submetidos a diferentes pHs, por 4 dias (A), 10 dias (B), 15 dias (C) e 20 dias (D). C = controle (pH 7,0); P2 = pH 9,0; P3 = 5,0. Nenhuma diferença estatística foi observada em A ou D ( $p > 0,05$ ). Em B e C, letras diferentes (a, b) representam diferença significativa no pós-teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH* PELO ENSAIO DE ELISA

Os resultados da concentração de VTG nos grupos expostos às diferentes temperaturas podem ser visualizados nos gráficos apresentados na Figura 12. Não houve diferenças significativas dos diferentes tratamentos em relação ao controle, e nem entre machos e fêmeas de mesmo tratamento, nos diferentes tempos de exposição.

FIGURA 12 – CONCENTRAÇÃO DE VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH* SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

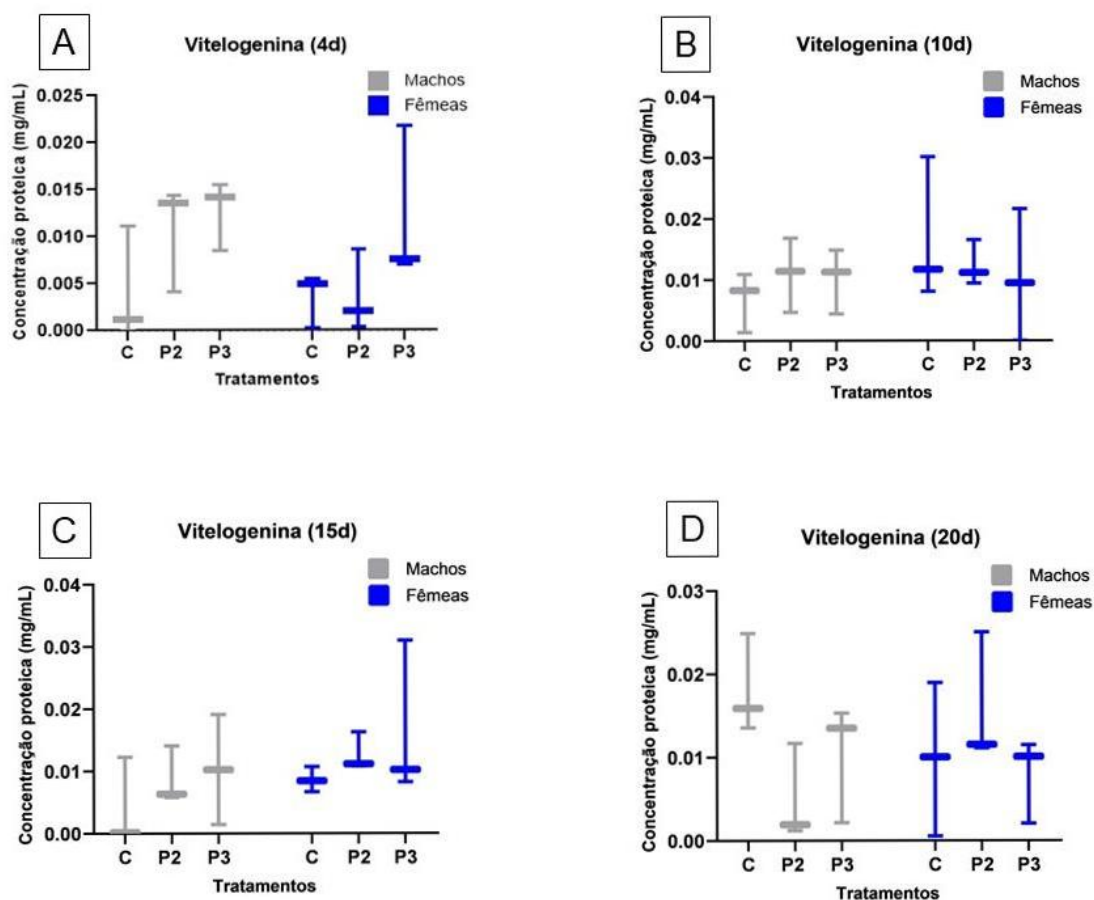


FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Comparação das medianas (com mínimo e máximo) das concentrações de vitelogenina (mg/mL) em *zebrafish* machos e fêmeas submetidos às diferentes temperaturas, por 4 dias (A), 10 dias (B), 15 dias (C) e 20 dias (D). C = controle (28°C); T2 = 31°C; T3 = 25°C. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os resultados da concentração de VTG nos grupos expostos aos diferentes pHs podem ser visualizados nos gráficos apresentados na Figura 13. Não houve diferenças significativas dos diferentes tratamentos em relação ao controle, e nem entre machos e fêmeas de mesmo tratamento, nos diferentes tempos de exposição.

FIGURA 13 – CONCENTRAÇÃO DE VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH* SUBMETIDOS A DIFERENTES pHs



FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Comparação das medianas (com mínimo e máximo) das concentrações de vitelogenina (mg/mL) em *zebrafish* machos e fêmeas submetidos a diferentes pHs, por 4 dias (A), 10 dias (B), 15 dias (C) e 20 dias (D). C = controle (pH 7,0); P2 = pH 9,0; P3 = 5,0. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

#### 4.4. OTIMIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE rt-qPCR PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH*

Após a extração, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro, tendo seu grau de pureza sido verificado a 260/280nm. Idealmente, a relação A260 / A280 entre 1,8 e 2,0 indica alta pureza do RNA extraído. Na Tabela 3 é possível ver a quantidade do RNA extraído das amostras, e sua pureza, sendo que os resultados indicam alto grau de pureza entre as diferentes amostras.

TABELA 3 – QUANTIDADE E PUREZA DO RNA TOTAL EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS DE *Danio rerio*

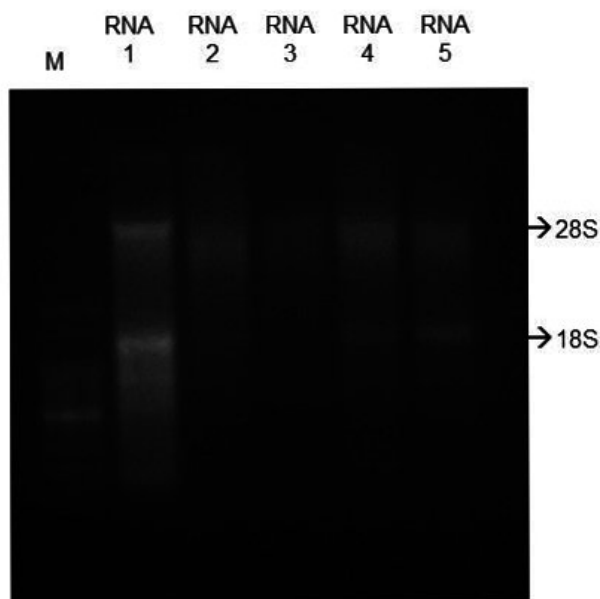
IDENTIFICAÇÃO	SEXO	QUANTIDADE DE RNA (ng/μL)	PUREZA A 260/280nm
T1 (20d) (1)	F	904,4	1,43
T1 (20d) (1)	M	1799,4	2,02
T1 (20d) (3)	F	1036,2	1,83
T1 (20d) (3)	M	2616,1	2,04
T1 (20d) (5)	F	2239,1	2,06
T1 (20d) (5)	M	1231,0	2,01
T2 (20d) (1)	F	73,4	1,86
T2 (20d) (1)	M	179,8	1,87
T2 (20d) (2)	F	838,6	2,01
T2 (20d) (2)	M	451,2	1,95
T2 (20d) (3)	F	77,8	1,89
T2 (20d) (3)	M	124,7	1,98
T3 (20d) (1)	F	130,5	1,89
T3 (20d) (1)	M	183,9	1,86
T3 (20d) (2)	F	286,6	1,88
T3 (20d) (2)	M	173,1	1,86
T3 (20d) (3)	F	269,3	1,90
T3 (20d) (3)	M	226,4	1,84
P2 (20d) (1)	F	902,2	1,97
P2 (20d) (1)	M	523,8	1,92
P2 (20d) (2)	F	1370,8	2,03
P2 (20d) (2)	M	231,0	1,97
P2 (20d) (4)	F	417,3	1,94
P2 (20d) (5)	M	611,8	2,01
P3 (20d) (1)	F	532,2	1,86
P3 (20d) (1)	M	58,3	1,80
P3 (20d) (2)	F	424,7	1,92
P3 (20d) (2)	M	475,4	1,87
P3 (20d) (4)	F	526,1	1,91
P3 (20d) (4)	M	446,1	1,95
TESTE 1	F	397,7	1,99
TESTE 2	F	256,3	1,98
TESTE 3	F	79,9	1,97

FONTE: O autor (2021).

NOTAS: T1 = experimento controle (28°C, pH 7,0); T2 = temperatura de exposição a 32°C; T3 = temperatura de exposição a 25°C; P2 = pH de exposição a 9,0; P3 = pH de exposição a 5,0; 20d = tempo de exposição de 20 dias; (1) = réplica ou aquário 1; (2) = réplica ou aquário 2; (3) = réplica ou aquário 3; (4) = réplica ou aquário 4; (5) = réplica ou aquário 5; TESTE = amostras purificadas destinadas apenas aos testes de padronização dos protocolos; F = fêmea; M = macho.

A Figura 14 mostra a imagem do gel de agarose (1%) contendo algumas amostras de RNA total, selecionadas ao acaso. É possível verificar, no gel, a presença de duas bandas mais nítidas de RNA nos poços contendo amostras, que correspondem aos RNA ribossomais 28S e 18S.

FIGURA 14 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE AMOSTRAS DE RNA DE *ZEBRAFISH*



FONTE: O autor (2021).

NOTAS: M = marcador molecular (controle positivo para o gel).

Após a etapa de conversão do RNA, o cDNA total foi quantificado em espectrofotômetro, tendo seu grau de pureza sido verificado a 260/280nm. Como para o RNA extraído, a relação A260 / A280 entre 1,8 e 2,0 indica alta pureza do cDNA. Na Tabela 4 é possível ver a quantidade do cDNA total das amostras, e sua pureza, sendo que os resultados indicam bom grau de pureza entre as diferentes amostras.

TABELA 4 – QUANTIDADE E PUREZA DO cDNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE *Danio rerio*

IDENTIFICAÇÃO	SEXO	QUANTIDADE DE cDNA (ng/μL)	PUREZA A 260/280nm
T1 (20d) (1)	F	1983,5	1,9
T1 (20d) (1)	M	2105,4	1,91
T1 (20d) (3)	F	2079,3	1,94
T1 (20d) (3)	M	2799,1	1,98
T1 (20d) (6)	F	2272,0	1,96
T1 (20d) (6)	M	1722,5	1,89
T2 (20d) (1)	F	811,7	1,75
T2 (20d) (1)	M	846,0	1,79
T2 (20d) (2)	F	1460,0	1,86
T2 (20d) (2)	M	1198,0	1,70
T2 (20d) (3)	F	711,0	1,73
T2 (20d) (3)	M	731,6	1,78
T3 (20d) (1)	F	754,5	1,78
T3 (20d) (1)	M	786,4	1,77
T3 (20d) (2)	F	1994,5	1,59
T3 (20d) (2)	M	814,4	1,76
T3 (20d) (3)	F	981,0	1,75
T3 (20d) (3)	M	918,9	1,72
P2 (20d) (1)	F	1430,4	1,84
P2 (20d) (1)	M	1090,7	1,83
P2 (20d) (2)	F	1840,3	1,90
P2 (20d) (2)	M	807,0	1,80
P2 (20d) (4)	F	1600,1	1,75
P2 (20d) (5)	M	1214,9	1,82
P3 (20d) (1)	F	1219,8	1,80
P3 (20d) (1)	M	964,3	1,71
P3 (20d) (2)	F	1023,2	1,79
P3 (20d) (2)	M	1075,0	1,83
P3 (20d) (4)	F	1067,3	1,83
P3 (20d) (4)	M	1019,9	1,82
TESTE 1	F	981,4	1,83
TESTE 2	F	892,8	1,80
TESTE 3	F	774,7	1,78

FONTE: O autor (2020).

NOTAS: T1 = temperatura de exposição a 28°C; T2 = temperatura de exposição a 32°C; T3 = temperatura de exposição a 25°C; P2 = pH de exposição a 9,0; P3 = pH de exposição a 5,0; 20d = tempo de exposição de 20 dias; (1) = réplica ou aquário 1; (2) = réplica ou aquário 2; (3) = réplica ou aquário 3; (4) = réplica ou aquário 4; (5) = réplica ou aquário 5; TESTE = amostras purificadas destinadas apenas aos testes de padronização dos protocolos; F = fêmea; M = macho.

Nas tentativas de validação dos *primers* e otimização da sua temperatura ótima de anelamento, utilizando PCR convencional, foram testadas diferentes variáveis, que estão apresentadas, juntamente com os resultados dessas tentativas, na Tabela 5.

TABELA 5 – VARIÁVEIS E CONDIÇÕES TESTADAS NA VALIDAÇÃO DOS *PRIMERS* PARA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

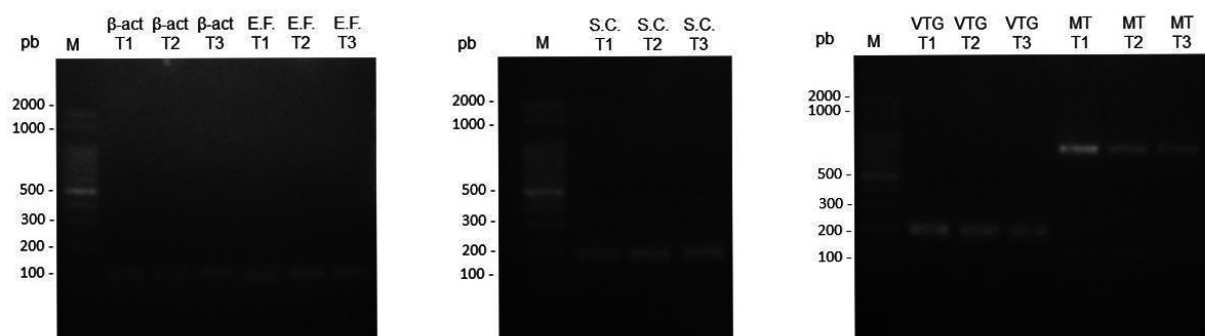
Variáveis Testadas	Condições	Considerações
Mix <i>SYBRGreen</i>	10 µl de Mix <i>SYBR Green</i> , 1 µl de <i>primer forward</i> (2uM), 1 µl de <i>primer reverse</i> (2uM), 2 µl de cDNA (50ng/uL) e 6 µl de água ultrapura autoclavada; 10 µl de Mix <i>SYBRGreen</i> , 1 µl de <i>primer forward</i> (2uM), 1 µl de <i>primer reverse</i> (2uM), 4 µl de cDNA (50ng/uL) e 4 µl de água ultrapura autoclavada.	Pouca ou ausência de amplificação nas duas concentrações de cDNA testadas (bandas fracas ou ausentes nos géis de agarose a 1%, 1,8% e 2%)
Mix PCR convencional	2 µl de cDNA (50ng/uL), 6,6 uL de Mix para PCR convencional, 2 µl de <i>primer forward</i> (2uM); 2 µl de <i>primer reverse</i> (2uM); 7,4 µl de água ultrapura autoclavada.	Amplificações de todos os genes, em todas as temperaturas de anelamento testadas (gel de agarose a 1,8%)
Temperaturas de anelamento dos <i>primers</i>	58, 60 e 62°C	Amplificações de todos os genes, em todas as temperaturas de anelamento testadas (gel de agarose a 1,8%)

FONTE: O autor (2021)

A Figura 15 mostra géis de agarose (1,8%), onde pode-se visualizar bandas de amplificação de cDNA (100 – 200pb) em todos os poços, ou seja, todos os *primers* amplificam os fragmentos esperados em todas as temperaturas testadas. Portanto, a temperatura a ser escolhida para trabalhos na rt-qPCR com esses *primers* foi a de 60°C, uma temperatura em que todos os *primers* geram amplificação de seus respectivos fragmentos, sendo uma das temperaturas de anelamento mais utilizadas em rt-qPCR.



FIGURA 15 – GÉIS DE AGAROSE (1,8%) DOS FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR CONVENCIONAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ANELAMENTO



FONTE: O autor (2021)

NOTAS: M = marcador molecular (*leader*); pb = pares de base;  $\beta$ -act = gene  $\beta$ -actina; E.F. = gene Fator de Elongamento; S.C. = gene carregador de soluto família 25  $\alpha$  membro 5; VTG = gene vitelogenina; MT = gene metalotioneína; T1 = temperatura de 58°C; T2 = temperatura de 60°C; T3 = temperatura de 62°C.

Na figura 15, pode-se notar ainda dois fragmentos diferentes (um de aproximadamente 700pb e outro de 100pb), nos poços relativos ao *primer* MT (metalotioneína), o que pode ocorrer devido à especificidade baixa do *primer*, ou à concentrações de cDNA e de *primer* muito altas ou muito baixas (o que também pode gerar amplificação de produtos inespecíficos); nos ensaios de rt-qPCR, a curva de *melting* comprovou que o *primer* para análise de MT apresenta alta especificidade, como mostrado adiante.

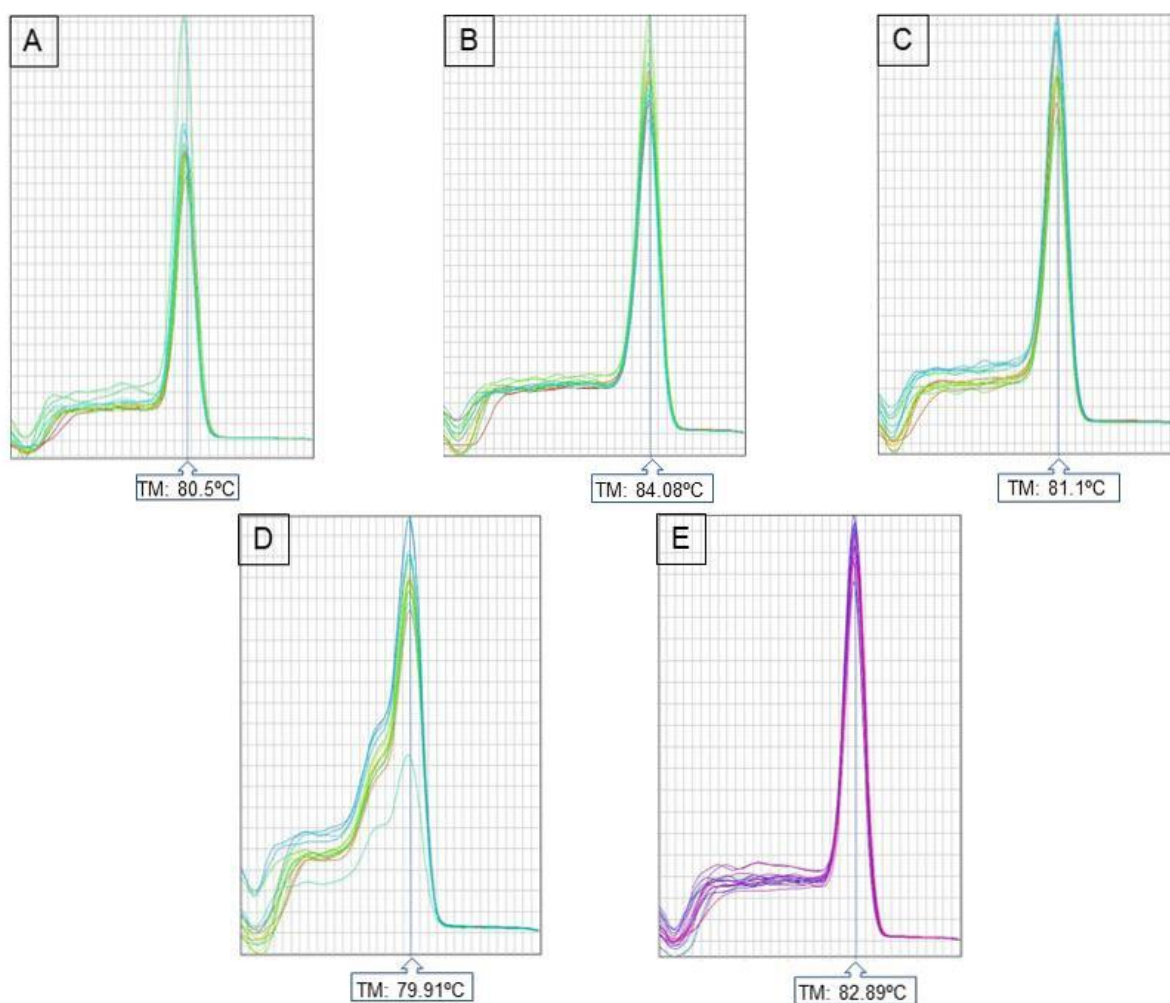
Na Tabela 6 são apresentados os valores de *slope*,  $r^2$  e eficiência da rt-qPCR para os genes testados, sob concentração de *primer* de 0,2 $\mu$ M. Os valores de *slope* e de eficiência estão relacionados, e indicam se, em cada ciclo de PCR, gera-se 2 fitas de DNA eficientemente; o valor de *slope* ideal é de aproximadamente -3,3; o valor de eficiência ideal varia de 90 a 110%. O valor de  $r^2$  indica a qualidade das réplicas, ou pipetagem, nos poços da placa; quanto mais próximo de 1,0 o valor de  $r^2$ , mais fieis foram as réplicas da placa. Já a curva de *melting* permite verificar a especificidade do produto amplificado; a temperatura de *melting* é a temperatura na qual metade do produto de PCR está dissociado e metade está hibridizado; quando a curva de *melting* apresenta diferentes temperaturas de *melting*, significa que foram amplificados diferentes fragmentos de DNA na PCR e, portanto, os *primers* não estão específicos para o fragmento-alvo. Todos os *primers* apresentaram graus satisfatórios de eficiência, *slope* e  $r^2$ , exceto o *primer* da VTG.

TABELA 6 – EFICIÊNCIA, *SLOPE* E  $R^2$  DOS GENES TESTADOS.

Gene	Eficiência (%)	<i>Slope</i>	$R^2$
B-actina	118	-2,94	0,98
Fator de Elongamento	106	-3,17	0,98
Transportador de Solute	108	-3,13	0,98
Vitelogenina	87	-3,64	0,83
Metalotioneína	107	-3,16	0,98

FONTE: O autor (2020).

A Figura 16 mostra as curvas de *melting* dos genes *housekeeping*  $\beta$ -actina, Fator de Elongamento e Transportador de Solute e dos genes de interesse VTG e MT, com *primers* na concentração de 0,2 $\mu$ M. Os três genes *housekeeping* e o gene de interesse MT apresentaram eficiências adequadas e curvas de *melting* que indicam especificidade dos *primers*. Já o gene da VTG apresentou curva de *melting* desparelha, o que significa que a concentração de 0,2 $\mu$ M de *primer* não é adequada e gera fragmentos diferentes do esperado.

FIGURA 16 – CURVAS DE *MELTING* DOS GENES ENDÓGENOS E DE INTERESSE

FONTE: O autor (2021)

NOTAS: Curva de *melting* dos genes *housekeeping*  $\beta$ -actina (A), Fator de Elongamento (B) e Transportador de Solute (C) e dos genes de interesse Vitelogenina (D) e Metalotioneína (E), com *primers* na concentração de 0,2 $\mu$ M. Pode-se visualizar picos semelhantes em A, B, C, e E, o que indica especificidade dos *primers* pelo fragmento de interesse. Já em D, pode-se visualizar picos disformes, o que indica baixa especificidade dos *primers* pelo fragmento de interesse na concentração testada (0,2 $\mu$ M). TM = temperatura de *melting*.

Para melhorar a eficiência do *primer* destinado à avaliação da expressão gênica de VTG na qPCR, foram realizados testes adicionais, com diferentes concentrações de *primer* (0,1; 0,2; 0,3; e 0,4  $\mu$ M). A Tabela 7 apresenta os valores de *slope*,  $r^2$  e eficiência da rt-qPCR para as concentrações testadas.

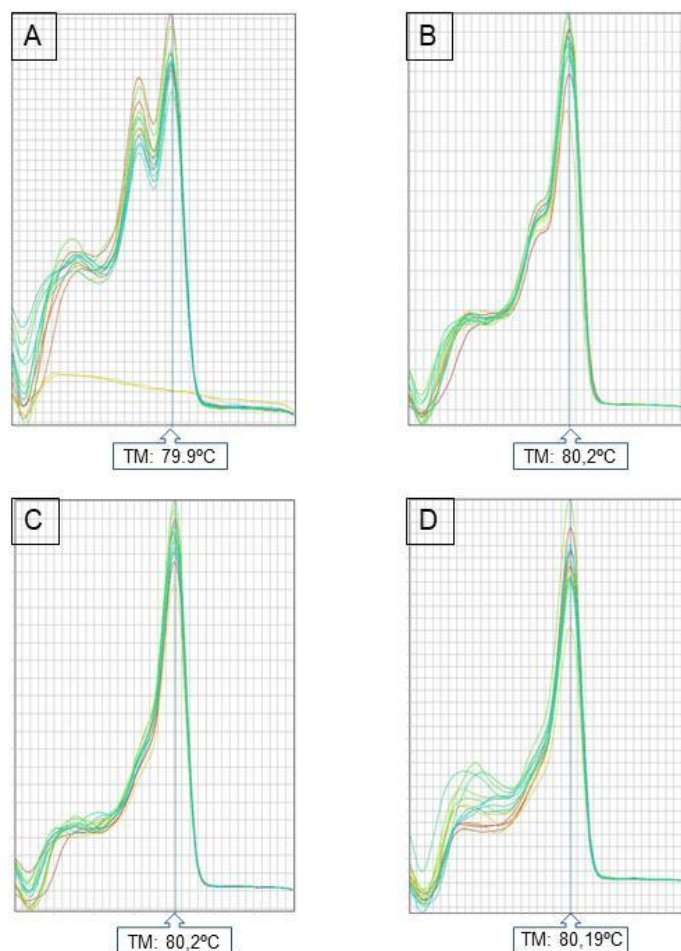
TABELA 7 – EFICIÊNCIA, *SLOPE* E  $r^2$  DO GENE VITELOGENINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *PRIMER*.

Concentração de <i>primer</i>	Eficiência (%)	<i>Slope</i>	$R^2$
0,1 $\mu$ M	94	-3,45	0,96
0,2 $\mu$ M	109	-3,11	0,94
0,3 $\mu$ M	111	-3,07	0,98
0,4 $\mu$ M	108	-3,12	0,98

FONTE: O autor (2020).

A Figura 17 mostra as curvas de *melting* do gene da VTG, nas diferentes concentrações testadas. Pode-se notar que, quanto maior a concentração do *primer*, maior eficiência e especificidade apresenta este *primer* na qPCR.

FIGURA 17 – CURVAS DE *MELTING* DO GENE VITELOGENINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *PRIMER*



FONTE: O autor (2021)

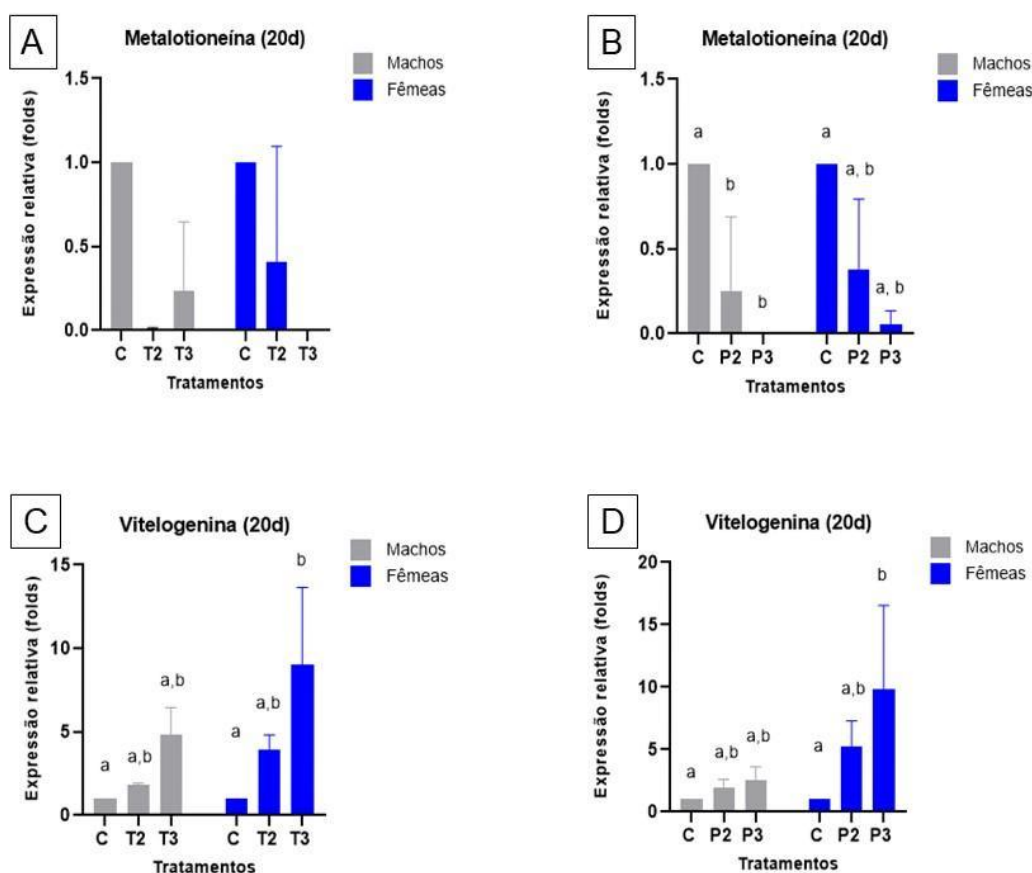
NOTAS: Curvas de *melting* do gene de interesse Vitelogenina, à 0,1 $\mu$ M (A), 0,2 $\mu$ M (B), 0,3 $\mu$ M (C) e 0,4 $\mu$ M (D) de *primer*. Em A e B, pode-se visualizar picos disformes, o que indica baixa especificidade dos *primers* pelo fragmento de interesse nas concentrações testadas. Já em C e D, pode-se visualizar picos semelhantes, o que indica especificidade dos *primers* pelo fragmento de interesse.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH*

Os resultados da expressão gênica de VTG e MT nos diferentes grupos podem ser visualizados nos gráficos apresentados na figura 18. Não houve diferenças significativas na expressão gênica de MT nos espécimes dos diferentes tratamentos de temperatura em relação ao controle, e nem entre machos e fêmeas de mesmo tratamento. Já em relação aos tratamentos com diferentes pHs, notou-se uma diminuição significativa da expressão gênica de MT em machos submetidos aos pHs 9,0 e 5,0 em relação aos controles de machos e de fêmeas. Fêmeas submetidas aos diferentes pHs não apresentaram diferenças significativas na expressão gênica de MT em relação ao controle.

Quanto à VTG, houve diferença significativa apenas entre os controles, dos machos e das fêmeas, e as fêmeas submetidas à 25°C (Figura 18C) e as fêmeas submetidas ao pH 5,0 (Figura 18D).

FIGURA 18 – EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH* SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS E pHs



FONTE: O autor (2021).

NOTAS: Comparação das médias (com desvio padrão) das expressões gênicas de metalotioneína (A e B) e vitelogenina (C e D) em *zebrafish* machos e fêmeas submetidos a diferentes temperaturas e pHs, por 20 dias. C = controle (pH 7,0; 28°C); T2 = 31°C; T3 = 25°C; P2 = pH 9,0; P3 = 5,0. Nenhuma diferença estatística foi observada em A ( $p > 0,05$ ). Em B, C e D, letras diferentes (a, b) representam diferença significativa no pós-teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS PARA ELISA

Devido à diversidade de condições existentes em literatura para os protocolos referentes às técnicas de ELISA e PCR, visto que moléculas diferentes podem ter comportamento distinto em um dado ensaio, foi necessário realizar adaptações ou ajustes nos protocolos para que esse trabalho fosse realizado. Portanto, uma boa parte do tempo utilizado para a realização desse estudo teve de ser dedicada a essa padronização dos protocolos.

Os primeiros protocolos de ELISA sanduíche testados, não nos permitiram tirar conclusões, uma vez que todos os poços emitiram absorbâncias semelhantes entre si, incluindo os poços de controle negativo (sem amostra) se comparados aos poços com controle positivo e com as amostras de *D. rerio* (dados marcados com um asterisco, na Tabela 2). Inicialmente a suspeita foi de contaminação e/ou reações inespecíficas entre as moléculas e os reagentes utilizados nos ensaios, assim, realizamos testes adicionais para verificar se todos os tampões e moléculas estavam em boas condições de uso e se não estavam reagindo entre si mesmos na ausência de amostra. A partir deste teste, pudemos concluir que nenhum dos reagentes ou moléculas utilizados estavam contaminados, e outras mudanças foram então necessárias.

Além disso, algumas observações foram realizadas em relação às soluções utilizadas neste teste. Por exemplo, PBS, PBS-T, TBS, TBS-T, anti-VTG e anti-MTC não reagiram com o substrato TMB sozinhos, e nem o TBM reagiu com a placa, portanto, puderam ser utilizados. Entretanto, detectamos que o tampão de bloqueio com leite ou BSA 2,0% e 4,0% de tween-20 apresentava valores um pouco acima do background tolerável (background tolerável = 0,2); já os valores de absorbância do leite ou BSA 0,5% e 1,0% de Tween-20 apresentaram absorbância abaixo do background máximo tolerável, sendo, portanto, mais recomendados. Apesar disso, não foi utilizado tween-20 no tampão de bloqueio dos protocolos finais. Os valores das absorbâncias dos anticorpos conjugados com HRP diluídos em TBS e TBS-T indicaram maior sensibilidade na diluição do anticorpo conjugado de 1:25000 em TBS-T (ou seja, nessa diluição, o Tween-20 aumenta a sensibilidade do anticorpo); nas demais

concentrações do conjugado, o Tween-20 aumenta a absorbância do conjugado em relação à sua ausência, ou seja, o Tween-20 aparenta ser um bom componente de diluição nas maiores diluições do conjugado. No entanto, em diluições menores do conjugado, ele deve ser evitado (pois aumenta a absorbância, mesmo em ausência de amostra), da mesma forma que maiores concentrações do conjugado também devem ser evitadas, pois sua absorbância é bem próxima do background máximo aceitável.

Após descartar a suspeita de contaminação e interações inespecíficas entre moléculas e reagentes, fizemos um teste para verificar se as microplacas de 96 poços poderiam estar contaminadas ou se diferentes marcas apresentavam diferenças de absorbância entre si. Utilizando ELISA de captura, pudemos concluir que ambas as placas testadas (*Thermo Nunc<sup>TM</sup>* e *Greiner<sup>TM</sup>*) apresentam resultados satisfatórios e absorbâncias muito semelhantes entre os tratamentos, portanto ambas estavam em condições de uso. Também foram testados controles com ausência de amostra, de sensibilização e de bloqueio, demonstrando que nenhum destes componentes apresentava problemas.

Adicionalmente, testamos diferentes arranjos de moléculas (pAb e mAb), diferentes concentrações de anticorpos conjugados (antiR-HRP e antiM-HRP), diferentes tampões de lavagem e diferentes pHs de sensibilização (pH 7,4 do tampão PBS e pH 9,6 do tampão carbonato-bicarbonato); novamente, todas as condições emitiram absorbância similar.

Levando em consideração os resultados obtidos nestes testes iniciais, foi possível concluir que o anticorpo conjugado não apresentava especificidade contra a cadeia pesada dos anticorpos primários utilizados; possivelmente, ele reconhece cadeias pesadas e cadeias leves de qualquer anticorpo, o que faz com que ele se ligue à cadeia leve do anticorpo de captura e, assim, emita sinal mesmo na ausência de amostra. No formato de ELISA sanduíche requer-se duas camadas de anticorpos, sendo que o da primeira camada (anticorpo de captura) é imobilizado na placa e os sítios livres são bloqueados pelo BSA ou leite, que impedem a interação desse anticorpo com o conjugado. Normalmente anticorpos conjugados reconhecem somente a cadeia pesada do anticorpo primário. Desta forma, o conjugado reagiria apenas com o anticorpo da segunda camada. O anticorpo primário da segunda camada depende exclusivamente da molécula alvo, presente na amostra, para permanecer na reação, caso contrário é



eliminado durante as lavagens e desta forma, não há sítios para ligação do conjugado, que conseqüentemente não irá reagir com o substrato para gerar cor. Porém, anticorpos conjugados que reconhecem também a cadeia leve do anticorpo primário (como neste caso), acabam disputando o espaço da cadeia leve com a amostra, cujos sítios de interação são próximos, e desta forma são capazes de se ligar melhor ainda na ausência da amostra, visto que não tem competidor. Fato este que explica a presença da reatividade do conjugado na ausência da amostra nos testes realizados.

Desta forma, a fim de eliminar tais reações inespecíficas, os testes posteriores foram realizados a partir do ELISA sanduíche indireto, através do sistema biotina-estreptavidina. Neste caso a biotina foi ligada diretamente no anticorpo primário da segunda camada e a estreptavidina é ligada à enzima que gera a cor, descartando desta forma a necessidade de usar uma terceira camada de anticorpo (anticorpo secundário conjugado). Além da interação dessas moléculas ser altamente forte e eficaz, a molécula de biotina é extremamente pequena, o que permite a ligação de várias de suas moléculas ao anticorpo, aumentando desta forma os sítios para interação do complexo estreptavidina-enzima, amplificando assim o sinal de reatividade do ensaio e aumentando conseqüentemente a sensibilidade do teste (DUNDAS et al., 2013; WU et al., 2018). Após os testes de padronização utilizando este sistema, foram estabelecidos os protocolos finais, utilizando as condições que apresentaram melhores resultados.

Apesar das amostras de *D. rerio* diluídas na proporção de 1:20, nos ensaios ELISA para detecção de MT mostrarem maiores absorbâncias, em relação a amostras mais concentradas, as absorbâncias das amostras ainda se encontravam baixas em relação à curva, provavelmente porque em concentrações altas a MT forme agregados que impedem sua ligação no anticorpo (KRIZKOVA et al., 2009; ALHAMA et al., 2011). Para otimização, foram testados dois diferentes tratamentos das amostras: desnaturação por aquecimento e desnaturação com tampão. O aquecimento das amostras permite a desnaturação e, conseqüentemente, a remoção de proteínas que não sejam a MT, uma vez que esta não desnatura a 70°C e, portanto, se mantém íntegra no sobrenadante após o tratamento com aquecimento (YUDKOVSKI et al., 2008; MILNEROWICZ e BIZÓN, 2010; WU et al., 2012). O tampão desnaturante, por

sua vez, desnatura todas as proteínas da solução, incluindo a MT, evitando aglomerações proteicas que podem impedir a ligação da proteína de interesse (nesse caso, a MT) aos anticorpos (ALHAMA et al, 2011; NAGAMATSU et al., 2020).

Porém, nem mesmo os tratamentos realizados com as amostras (aquecimento e tampão desnaturante) aumentaram a especificidade anticorpo-proteína, e os testes de ELISA competitivo e ELISA de captura para essa proteína não apresentaram diferenças nas absorbâncias em relação aos testes de ELISA sanduíche, em nenhuma das condições testadas. Provavelmente, o sinal baixo em todos os ensaios previamente testados com a MT se deva à baixa especificidade do anticorpo de captura, o qual, além de ser policlonal, foi produzido contra MT recombinante (ou seja, não têm modificações pós-traducionais) de outra espécie (*O. niloticus*), o que pode dificultar a interação antígeno-anticorpo. Outra possibilidade pode ser, ainda, devido à ausência de indução proteica nos animais, uma vez que estes não foram expostos à metais pesados (portanto, sua taxa de MT é basal).

## 5.2 PAPEL DA TEMPERATURA E pH NA QUANTIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA E VITELOGENINA EM *ZEBRAFISH*

Os níveis basais de MT variaram entre 0 a 0,06 mg/mL em machos, e de 0 a 0,03 mg/mL em fêmeas. Os dados mostram que não há diferença significativa entre os grupos expostos a diferentes temperaturas pelo método de ELISA utilizado, o que é corroborado pelo qPCR. Em relação aos grupos expostos aos diferentes pHs, o método de ELISA apontou uma diminuição nos níveis de MT em machos e fêmeas nos tempos de 10 e 15 dias, com uma normalização ao 20º dia de exposição. Os resultados da avaliação da expressão gênica de MT, ao 20º dia de exposição, sugerem que esses níveis voltam a cair nos grupos tratados com diferentes pHs.

Como demonstrado por Nagamatsu et al. (2020) e Mihailovic et al. (2015), diferentes espécies apresentam diferentes padrões de expressão de MT mesmo quando expostas a concentrações similares de metais indutores. Guinot et al. (2012), por exemplo, encontraram diferenças significativas entre a concentração de MT em *Sparus aurata* submetidos a 30°C, em comparação aos animais

submetidos a 22°C e 27°C. Os mesmos autores também relatam, no estudo, que encontraram uma correlação entre os níveis de MT e ferro no fígado desses animais, sugerindo que isso esteja relacionado com a hipertermia, levando ao estresse oxidativo pelo acúmulo de ferro no fígado, e assim induzindo a síntese de MT neste órgão em temperaturas mais altas.

Van Cleef-Toedt et al. (2001) também demonstraram que *Fundulus heteroclitus*, em período fora da desova, exibiram diferenças significativas na expressão gênica de MT em fígado, brânquias e intestino, quando expostos a temperaturas mais altas que sua temperatura ideal, (26°C, em comparação a 19°C do controle); os autores relatam que o mesmo não ocorreu para indivíduos expostos a temperaturas mais baixas que o controle (10°C), tanto em animais dentro como fora do período de desova.

O estresse térmico e sua relação com os níveis de MT também é estudado em outros organismos utilizados em avaliações de impacto ambiental em ambientes aquáticos, como moluscos bivalves. Lee e Nam (2016) encontraram diferenças significativas na expressão de MT em *Haliotis discus hannai*, em resposta à elevação de temperatura (25°C) em relação ao controle (20°C), em brânquias, músculo e hepatopâncreas. Brânquias e músculo recuperaram os níveis de mRNA de MT ao fim do tratamento térmico (30°C + 24h), mas o mesmo não foi observado no hepatopâncreas. Kamel et al. (2014) também apontaram uma correlação entre temperatura e níveis de MT no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*; os autores encontraram maior acúmulo de MT nas glândulas digestivas conforme o aumento da temperatura da água ao longo de quatro meses (18 a 29°C), tanto em um corpo d'água mais impactado quanto em outro, mais preservado.

Os padrões de expressão de MT para a espécie *D. rerio*, podem ser mais facilmente validados quando ocorre a indução de MT através do uso de metais tóxicos, permitindo, então, a análise desta espécie como um bom bioindicador em relação a esta proteína (CHAN et al., 2006; GUO et al., 2018). Guo et al. (2018) expuseram fêmeas de *zebrafish* a 26°C ou 34°C, e à 0, 197, ou 200 µg/L de cádmio, isoladas ou em combinação, por 7 dias. A expressão gênica de MT aumentou quatro vezes em peixes mantidos à 34°C em relação ao controle (26°C, sem exposição à cádmio). O controle e o grupo exposto à cádmio (197µg/L) não tiveram expressão gênica de MT diferentes. Já o grupo co-tratado

com cádmio (200µg/L) e com 34°C dobrou os níveis de expressão gênica de MT em relação ao grupo mantido a 34°C apenas. Alguns estudos também comprovam que fêmeas de *zebrafish* aumentam os níveis de expressão gênica de MT em seus ovários e fígado, quando expostas à cádmio, podendo, inclusive, passar esse metal à sua progênie que, conseqüentemente, também apresenta altos níveis de expressão de MT (WU et al., 2012; ZHU et al., 2018).

Chan et al (2006) demonstraram também um aumento da expressão gênica de MT em *zebrafish* quando expostos à mercúrio, cobre, zinco e cádmio, sendo o mercúrio o maior indutor em estudos *in vivo*, e o cádmio o maior indutor em estudos *in vitro*, e validam a expressão gênica de MT nesses animais como biomarcador para detectar a presença de mercúrio e cádmio na água. Além disso, a indução de mRNA de MT também parece estar relacionada à órgãos específicos do *zebrafish*. Estudos mostram que animais expostos à mercúrio têm expressão gênica de MT alterada no fígado, mas não em cérebro e músculo esquelético, por exemplo (GONZALEZ et al., 2005). Talvez o fato de empregar o extrato total, isto é, o corpo inteiro do animal, mascare os níveis de expressão proteica e gênica de MT em órgãos-alvo especificamente envolvidos na produção e armazenamento dessa proteína, como fígado e rim.

No entanto, sem a exposição à metais tóxicos, apenas variando os parâmetros físicos e químicos do ambiente, os níveis detectáveis de MT são muito baixos, como mostram os dados da concentração de MT neste trabalho. Isto pode ser corroborado pelo fato de que, comparada a outras espécies (TOM et al., 2004; CHEUNG et al., 2005; GIRGIS et al., 2019), os níveis de expressão gênica de MT em *zebrafish* aumentam em grau muito menor, mesmo quando os organismos são expostos à metais tóxicos (GUO et al., 2018).

Em relação à VTG, os níveis basais variaram entre 0 a 0,025 mg/mL em machos, e de 0 a 0,03 mg/mL em fêmeas. Os resultados da concentração basal de VTG nos grupos expostos às diferentes temperaturas e pHs não apontam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, e nem entre machos e fêmeas de mesmo tratamento, nos diferentes tempos de exposição. Esses resultados também são corroborados pelas análises de expressão gênica de VTG nos animais, que demonstram que apenas dois grupos de fêmeas (as submetidas a 25°C e à pH 5,0) são diferentes aos controles, mas que os níveis de expressão de VTG não diferem entre machos e fêmeas.

Como no caso da MT, sem a exposição à agentes estrogênicos indutores os níveis detectáveis de VTG são muito baixos, como mostram os dados da concentração de VTG neste trabalho. Em estudos com substâncias desreguladoras endócrinas utilizando *D. rerio*, a expressão dessa proteína fica mais evidente, principalmente em machos. Holbech et al. (2001) expuseram *zebrafish* machos a 10ng/L de estradiol por 7 dias, e detectaram um aumento de 200 vezes na concentração de VTG (em ensaios ELISA de corpo inteiro) em relação ao grupo controle, os quais apresentaram concentração de 1µg de VTG por grama de animal.

A reprodução dos peixes é um mecanismo que tem se mostrado ser muito influenciado pela temperatura, uma vez que este fator afeta a síntese hormonal no eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, os mecanismos de secreção desses hormônios e até mesmo a determinação do sexo nesses organismos (KRAAK e PANKHURST, 1997; SATO et al., 2006; PANKHURST e KING, 2010; NAVARRO-MARTÍN et al, 2011; HONEYCUTT et al., 2019). Animais tendem a apresentar uma temperatura ótima para a produção de hormônios gonadais, e uma elevação anormal da temperatura ótima pode provocar a diminuição de hormônios reprodutivos no plasma desses organismos (KRAAK e PANKHURST, 1997).

Estudos mostram que pHs muito baixos também podem interferir na reprodução dos peixes. Inibição da desova e redução da produção e eclodibilidade de ovos maduros, devido a distúrbios da produção proteica, o que leva a uma redução na formação de vitelo, são alguns dos efeitos provocados por pH ácido nesses animais (MOUNT, 1973; BEAMISH, 1976; RUBY et al., 1977; TAM et al., 1987).

Korsgaard et al. (1986) encontraram respostas vitelogênicas em salmonídeos (altos níveis proteicos e de mRNA em plasma e fígado) expostos a tratamento hormonal concomitante com aumentos na temperatura, mas não em temperaturas altas no mês de aclimação dos animais. Ou seja, os níveis de VTG e seu mRNA no soro ou fígado não aumentaram acima dos níveis dos controles não tratados em indivíduos previamente aclimatados em temperaturas altas. Já King et al. (2003) encontraram níveis de VTG plasmática mais baixos em *Salmo salar* expostos à temperatura de 22°C, em comparação com 14°C, durante o período do outono.

Craig e Baksi (1977) notaram que a produção de ovos em *Jordanella floridae*, foi prejudicada em pHs ácidos (6,0, 5,5, 5,0 e 4,5) em relação ao controle (pH 6,8) em todos os níveis de exposição. Mount (1973) também encontrou diminuição na produção de ovos em *Pimephales promelas* expostos a pHs ácidos (4,5, 5,2 e 5,9). Já Tam *et al.* (1987), não encontraram diferenças entre os níveis de VTG em plasma de fêmeas de *Salvelinus fontinalis* expostas à pH ácido (4,48), em relação ao pH controle (7,34), durante a estação reprodutiva da espécie.

Porém, neste trabalho, os resultados não mostraram influência da variação de temperatura e pH na expressão proteica de VTG e, além disso, fêmeas e machos não diferiram entre si na produção dessa proteína (a não ser na expressão gênica de VTG de fêmeas expostas a 25°C e pH 5,0 em relação aos machos controle). O anticorpo policlonal produzido contra a VTG de *O. niloticus* reconhece a VTG de outras espécies, incluindo a VTG de *D. rerio*, uma vez que esta é uma proteína altamente conservada entre diferentes espécies, como já demonstrado em trabalhos anteriores (NILSEN *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2016; YAMAMOTO *et al.*, 2018). Porém, o uso da VTG de tilápia para a curva pode ter influenciado na quantificação desta proteína no extrato total de *D. rerio*. As divergências, ainda que em pequena escala, na sequência de aminoácidos e, conseqüentemente, da estrutura proteica, entre as VTGs de diferentes espécies (SO *et al.*, 1985; NILSEN *et al.*, 2004) pode afetar o padrão de afinidade e reatividade antígeno-anticorpo, podendo desta forma subestimar a concentração de VTG de *D. rerio* nas amostras coletadas.

O alto desvio padrão nos resultados de concentração proteica, e a similaridade entre machos e fêmeas (tanto na concentração proteica quanto na expressão gênica) provavelmente se deva à vários fatores que, combinados, dificultaram a detecção e análise de VTG nestes animais. Além disso, estudos apontam uma ampla faixa de expressão proteica de VTG em peixes, principalmente no plasma desses animais, o que pode variar de poucos ng/mL em peixes machos imaturos a mais de 100mg/mL em fêmeas (COPELAND *et al.*, 1986; TYLER *et al.*, 1996; TYLER *et al.*, 2002; NILSEN *et al.*, 2004; HARA *et al.*, 2007).

No caso do *zebrafish*, tanto machos quanto fêmeas desenvolvem, num primeiro estágio de desenvolvimento, gônadas femininas, independentemente

do sexo genotípico. As fêmeas naturalmente continuam a maturação dos oócitos em ovários. Já nos machos, os testículos começam a se desenvolver e os espermatócitos começam a aparecer apenas após 30 dias de seu nascimento (TAKAHASHI, 1977; UCHIDA et al., 2002). É possível que nem todos os organismos utilizados nos ensaios estivessem com suas gônadas totalmente desenvolvidas, ou em período reprodutivo. Além disso, alguns estudos com outras espécies de peixes também apontam que há diferença nos níveis de VTG entre animais que estão em idades reprodutivas diferentes (COPELAND et al., 1986). Apesar disso, foram utilizados nesse estudo um número expressivo de animais por grupo (75 indivíduos), o que certamente minimiza essas possíveis diferenças.

Um segundo fator que poderia ter interferido, foi o fato de *zebrafish* machos e fêmeas terem sido aclimatados e mantidos, durante os bioensaios, juntos, nos mesmos aquários. Estudos apontam que pequenos níveis de VTG, em machos não induzidos, podem ser ocasionados pela secreção natural de esteróides pelas fêmeas de *D. rerio* na água (KRAMER et al., 1998; HARRIES et al., 2000; FENSKE et al., 2001). No entanto, essa não deve ser uma condição que possa interferir de modo significativo, visto que no *rack* o fluxo de água é muito intenso e ocorre um sistema de filtragem que favorece uma melhor condição da água, nesse caso.

Ainda, sabe-se que a VTG é degradada em peptídeos de menor tamanho, como lipovitelina e fosvitina, para finalmente formar o vitelo dos ovos nas fêmeas. Para isso, enzimas proteolíticas atuam nos ovários, desintegrando a VTG (ARUKWE, e GOKSØYR, 2003; NILSEN et al., 2004; FINN, 2007; READING et al., 2017). Alguns estudos citam a necessidade da retirada dos ovários antes de realizar a análise da concentração de VTG nesses animais, para evitar que ocorra degradação dessa proteína, ou realizar a análise de VTG através do plasma, já que em período de maturação sexual e em animais expostos a substâncias estrogênicas o nível de VTG no plasma é alto (HEPPELL et al., 1999; NILSEN et al., 2004; DAUD et al., 2016). Porém, o pequeno tamanho do *zebrafish* inviabilizou essa estratégia, tendo em vista o grande número de coletas e de peixes eutanasiados e homogeneizados por coleta. No entanto, os animais foram imediatamente preservados a baixas temperaturas, o que dificultaria essa

degradação da VTG, mas é um tipo de situação que é inerente aos trabalhos com essa proteína.

Ainda assim, a maioria das fêmeas utilizadas nos bioensaios estava em fase de ovulação e sabe-se que grande parte das proteínas presentes nos ovos de fêmeas de zebrafish é lipovitelina (SELMAN et al., 1993; HOLBECK et al., 2001). Algumas análises do extrato total de *D. rerio* através da técnica de *Western blotting*, realizadas por nosso laboratório (dados não mostrados e não publicados), utilizando os anticorpos anti-VTGR aplicados no ELISA deste trabalho, apresentam bandas na altura de aproximadamente 30-40 kDa para fêmeas e machos, tamanho esse similar aos apresentados na literatura sobre a lipovitelina (READING et al., 2017; SULLIVAN e YILMAZ, 2018). Isso pode indicar que este anticorpo reconhece a lipovitelina de *zebrafish*, um fragmento da VTG que provavelmente foi clivada pelas proteases presentes nos ovários dos animais homogeneizados. Estudos com várias espécies de peixes relatam atividade cruzada de anticorpos desenvolvidos contra VTG, que também reconhecem lipovitelina e outros produtos de sua proteólise, e vice-versa (SILVERSAND et al., 1993; SHIMIZU et al., 2002; FUKADA et al., 2003; HARA et al., 2007), incluindo em *zebrafish* (HOLBECH et al., 2001).

Finalmente, os resultados apresentados com esse estudo mostram através de duas técnicas de biologia molecular bastante conhecidas e validadas para estudos similares na literatura, que os parâmetros temperatura e pH parecem não interferir com a expressão da VTG e da MT em *D. rerio*. Como os dados encontrados na literatura para essa espécie são escassos dentro do propósito do presente estudo, acreditamos que as informações apresentadas destacam a importância do papel das variações de temperatura e pH em estudos ambientais, particularmente na validação de biomarcadores moleculares, como é o caso dessas duas proteínas. No entanto, um aspecto que merece destaque e não foi realizado nesse estudo, mas que se encontra em andamento, é a obtenção de um controle positivo para a expressão das proteínas estudadas, bem como de uma curva com as proteínas extraídas de *zebrafish*. Para isso dois experimentos estão sendo realizados, onde através da exposição ao cádmio e 17 $\beta$ -estradiol teremos a confirmação de indução de MT e VTG, respectivamente, em espécimes de *D. rerio*. Os resultados provenientes desses dois experimentos serão importantes para a confirmação dos protocolos desenvolvidos bem como



para a validação das informações obtidas com o uso das técnicas aplicadas, e serão considerados para a publicação dos dados apresentados nesse estudo.

## 6 CONCLUSÕES

- Os protocolos desenvolvidos e padronizados para ELISA e PCR em *D. rerio* mostraram-se eficazes aos objetivos propostos no estudo, visto que detectam concentrações mínimas de expressão proteica e gênica, respectivamente, nas amostras.
- As variações de temperatura e pH testadas nas condições experimentais desse estudo, não interferem significativamente nos níveis de VTG em *D. rerio* após diferentes tempos de exposição.
- As variações de temperatura e pH testadas nas condições experimentais desse estudo, não interferem significativamente na expressão gênica de VTG em *D. rerio* machos após 20 dias de exposição; apesar de ter havido um aumento significativo nos níveis de VTG em fêmeas à temperatura de 25°C e ao pH 5,0, este resultado não é impeditivo para o uso deste biomarcador em machos.
- As variações de temperatura testadas nas condições experimentais desse estudo, não interferem significativamente na expressão proteica e gênica de MT de *D. rerio*.
- Os níveis de MT alterados nos grupos expostos ao pH não impedem o uso deste biomarcador visto que ocorre diminuição, e não aumento, de sua expressão proteica.
- As variações de pH testadas nas condições experimentais desse estudo, diminuíram significativamente a expressão gênica de MT em machos expostos a pH 5,0, após 20 dias de exposição.
- Os resultados mostram que esses parâmetros, temperatura e pH, não são impeditivos para o uso da MT e VTG como biomarcadores moleculares de exposição a metais tóxicos e agentes desreguladores endócrinos, respectivamente, para *D. rerio*.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, M. A. et al. Detection of Metallothionein Protein Biomarkers (MTs) and Pinocytosis Activity in Gambusia Fish (*Gambusia affinis*) Exposed to Cadmium. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 18, n. 3, p. 989-994, 2019.
- AHEL, M.; GIGER, W. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. **Chemosphere**, v.26, n. 8, p.1461-1470, 1993.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALESTRÖM, P. et al. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 3, p. 213–224, 2020.
- ALMAHA, J. et al. Total metallothionein quantification by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection after monobromobimane derivatization. **Environmental Research Journal**, v. 5, n. 5, p. 1–17, 2011.
- ALVARADO, N. E. et al. Immunolocalization of metallothioneins in different tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd. **Histology and Histopathology**, v. 22, p. 719-728, 2007.
- AMIARD, J. C. et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 160-202, 2006.
- APOLLONIO, L. G. et al. Matrix Effect and Cross-Reactivity of Select Amphetamine-Type Substances, Designer Analogues, and Putrefactive Amines using the Bio-Quant Direct ELISA Presumptive Assays for Amphetamine and Methamphetamine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 208-213, 2007.
- ARAÚJO, F. G. **Ácidos graxos dietéticos em parâmetros reprodutivos de fêmeas de Zebrafish (*Danio rerio*)**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- ARCAND, Y. et al. Solubility of pentachlorophenol in aqueous solution: the pH effect. **Water research**, v. 29, n. 1, p. 131-136, 1995.
- ARUKWE, A.; GOKSØYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, v.2, n.4, 2003.
- ASENSIO, L. et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Food Control**, v. 19, p. 1-8, 2008.

BALBINOT, F. et al. **A utilização do bioindicador *Danio rerio* (zebrafish) em estudos de ecotoxicologia aquática.** In: x Semana Científica Unilasalle – SEFIC, 2014, Canoas, RS.

BARRETO, L. S. et al. Urban effluents affect the early development stages of Brazilian fish species with implications for their population dynamics.

**Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, 2020.

BEAMISH, R. J. Acidification of lakes in Canada by acid precipitation and the resulting effects of fishes. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 6, p. 501-514, 1976.

BERVOETS, L. et al. Differential Hepatic Metal and Metallothionein Levels in Three Feral Fish Species along a Metal Pollution Gradient. **PlosOne**, v. 8, n. 3, 2013.

BIANCHINI, A.; MARTINS, S. E.; JORGE, M. B. **O modelo do ligante biótico e suas aplicações em ecotoxicologia.** No prelo, 2009.

BOBOSHA, K. et al. Field-Evaluation of a New Lateral Flow Assay for Detection of Cellular and Humoral Immunity against *Mycobacterium leprae*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, 2014.

BOURDINEAUD, J. P. et al. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1787-1792, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, 1976.

BRADFORD, Y. M. et al. Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. **ILAR Journal**, v. 58, n. 1, p. 4-16, 2017.

BRITO, I. A. et al. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, p. 615-625, 2012.

CHAN, K. M. et al. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. **Marine Environmental Research**, v. 62, p. 83–87, 2006.

CHAVES, K. S. **Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A,  $\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul.** 134f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

CHEN, W. et al. Expression pattern of metallothionein, MTF-1 nuclear translocation, and its DNA-binding activity in zebrafish (*Danio rerio*) induced by zinc and cadmium. **Environmental Chemistry**, v.26, n.1, p.110-117, 2007.

CHEUNG, A. P. L. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1731, p. 191 – 201, 2005.

CHOWDHURY, M. J. et al. Tissue-Specific Cadmium and Metallothionein Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 48, p. 381-390, 2005.

CHU, M. et al. Development of ELISA for metallothionein-II allows determination of heavy metal pollution of fresh water. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2113-2122, 2016.

COPELAND, P.A. et al. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 83, p.487–493, 1986.

COSTA, D. D. M. **Avaliação de desreguladores endócrinos utilizando a vitelogênese em *Rhamdia quelen* (Quay e Gaimar, 1824)**. 141f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

COSTA, D. D. M. et al. Characterization, specificity and sensibility of produced anti-*Rhamdia quelen* vitellogenin in Brazilian fish species. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p 1721-1732, 2016.

CRAIG, G. R.; BAKSI, W. F. The effects of depressed pH on flagfish reproduction, growth and survival. **Water Research**, v. 11, p. 621-626, 1977.

CROCKETT, E. L. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 178, p. 795-809, 2008.

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. Vienna: Humana Press, 2009.

CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. C. Sistemas aquáticos continentais. In: CUNHA, D. G. F.; CALIJURI, M. C. **Engenharia ambiental**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, p. 161-177.

DALZUCHIO, T. et al. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brasil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, p. 283-298, 2016.

DANTZLER, W. H. Temperature Relationships: From Molecules to Biogeography. In: **Comparative Physiology**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 1391-1444.

DAUD OM, A. et al. Use of Vitellogenin as Biomarker Indicator in Sex Identification of Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*). **Poultry, Fisheries**

**and Wildlife Sciences**, v. 4, n.2, 2016.

DAVID, J. S. **Análise da presença de compostos estrogênicos através do estudo do biomarcador vitelogenina como subsídio para o planejamento da Bacia Rio Bacanga, São Luís, MA.** 92 f. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade de Ecossistemas). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

DOERING, J. A. et al. Identification and response to metals of metallothionein in two ancient fishes: White sturgeon (*Acipenser transmontanus*) and lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 2015.

DUNDAS, C. M. et al. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9343–9353, 2013.

EDMUNDS, R. C. et al. Comparative characterization of a temperature responsive gene (lactate dehydrogenase-B, *ldh-b*) in two congeneric tropical fish, *Lates calcarifer* and *Lates niloticus*. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 558-569, 2009.

ENGVALL, E.; PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry Pergamon Press**, v. 8, p. 874-879, 1971.

EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. Ion Transport, Osmoregulation, and Acid-Base Balance. In: **The Physiology Of Fishes**. 3. ed. London: Taylor & Francis Group, 2006. p.117-230.

FABRIN, T. M. C. et al. Performance of biomarkers metallothionein and ethoxyresorufin O-deethylase in aquatic environments: A meta-analytic approach. **Chemosphere**, 2018.

FENSKE, M. et al. Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 129, p. 217-232, 2001.

FERNANDES, A. F. The use of biomarkers in aquatic toxicology studies. **Revista Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos**, v. 12, n. 1, p.67-86, 2005.

FINN, R. N. Vertebrate Yolk Complexes and the Functional Implications of Phosvitins and Other Subdomains in Vitellogenins. **Biology of reproduction**, v. 76, p. 926–935, 2007.

FOLLE, N. M. T. **Efeito tóxico e papel desregulador endócrino estrogênio do 2,4,6-tribromofenol (tbf) em peixes teleósteos**. 143 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular). Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

FUKADA, H. et al. Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 134, p. 615–623, 2003.

GAGNÉ, F. **Biochemical Ecotoxicology: Principles and Methods**. Elsevier, 2014.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, 2013.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, 2013.

GARNAYAK, S. K. et al. Vitellogenin in Asian catfish, *Clarias batrachus*: Purification, partial characterization and quantification during the reproductive cycle by ELISA. **Aquaculture**, v. 392, n. 395, p. 148-155, 2013.

GIRGIS, S. M. et al. Seasonal assessment of some heavy metal pollution and Metallothionein gene expression in cultured *Oreochromis niloticus*. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 131, 2019.

GONZALEZ, P. et al. Comparative Effects of Dietary Methylmercury on Gene Expression in Liver, Skeletal Muscle, and Brain of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental science and technology**, v. 39, n. 11, p. 3972-3980, 2005.

GREEN, M. R. SAMBROOK, J. Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 436-457, 2019.

GUINOT, D. et al. Long-term effect of temperature on bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. **Chemosphere**, v. 87, p. 1215–1221, 2012.

GUO, S. Effects of heat and cadmium exposure on stress-related responses in the liver of female zebrafish: Heat increases cadmium toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 1363–1370, 2018.

HAMZA-CHAFFAI, A. et al. Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.111, n. 2, p. 329-341, 1995.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B. **Ecological and environmental physiology of fishes**. Oxford: Oxford University Press, 2012.

HARA, A. et al. Carp (*Cyprinus carpio*) Vitellogenin: Characterization of Yolk Proteins, Development of Immunoassays and Use as Biomarker of Exposure to Environmental Estrogens. **Environmental Sciences**, v. 14, n. 2, p. 095–108, 2007.

HARRIES, J. E. et al. Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 3003-3011, 2000.

HEPPELL, S. A. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of Vitellogenin in Temperate Basses (*Genus Morone*): Plasma and In Vitro Analyses. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 128, p.532–541, 1999.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. Relações Térmicas. In: **Fisiologia Animal**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012 a. p. 205-252.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. Respiração Externa: A Fisiologia da Respiração. In: **Fisiologia Animal**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012 b. p.547-580.

HOLBECH, H. et al. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 130, p. 119-131, 2001.

HOLZER, M. et al. Freshwater Resources: The Challenges of Quantity and Quality. **The Earth Scientist**, v. 36, n. 3, p. 18-21, 2020.

HONEYCUTT, J. L. et al. Warmer waters masculinize wild populations of a fish with temperature-dependent sex determination. **Nature**, v. 9, n. 6527, 2019.

HOSSEINI, S. et al. **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z**. Singapore: Springer, 2018.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, 2013.

HOWELLS, E. B. Measuring temperature. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v.19, n. 10, p.563-567, 2018.

HSU, C. et al. Paper-Based ELISA for the Detection of Autoimmune Antibodies in Body Fluid: The Case of Bullous Pemphigoid. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 4605-4610, 2014.

INABA, K. et al. Effects of salinity, pH and temperature on aqueous solubility of four organotin compounds. **Water Research**, v.29, n.5, p.1415-1417, 1995.



INÁCIO, A. F. **Metalotioneína e Metais em *Geophagus brasiliensis* - Acará.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Ovidio Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P. et al. Zebrafish: a model for behavioral pharmacology. **Revista de Farmacología de Chile**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2012.

IUPAC. Measurement of pH: definition, standards, and procedures. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p.2169-2200, 2002.

IVENS, K. O. et al. Commercial Milk Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit Reactivities to Purified Milk Proteins and Milk-Derived Ingredients. **Journal of Food Science**, v. 0, n. 0, 2016.

JONES, P. D. et al. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. **Water Science and Technology**, v. 42, n. 7-8, p. 1-14, 2000.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 1, n. 5, p. 81-97, 2010.

KAMEL, N. et al. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 6108–6123, 2014.

KING, H. R. et al. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in female Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 63, p. 153–167, 2003.

KORSGAARD, B. et al. The Effect of Temperature on the Vitellogenic Response in Atlantic Salmon Post-smolts (*Salmo salar*). **General and comparative endocrinology**, v. 62, p. 193-201, 1986.

KRAAK, G. V. D.; PANKHURST, N. W. Temperature effects on the reproductive performance of fish. In: WOOD, C.; MCDONALD, D. (Ed.). **Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 159-176.

KRAMER, V. J. et al. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. **Aquatic Toxicology**, n. 40, p. 335–360, 1998.

KRIZKOVA, S. et al. Comparison of Metallothionein Detection by Using Brdicka Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Employing Chicken Yolk Antibodies. **Electroanalysis**, v. 21, n. 23, p. 2575 – 2583, 2009.

- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95-125, 2006.
- LAURICELLA, M. A. et al. An rK28-Based Immunoenzymatic Assay for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis in Latin America. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2016.
- LEE, S. Y.; NAM, Y. K. Transcriptional responses of metallothionein gene to different stress factors in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p. 530-541, 2016.
- LE MORVAN, C. et al. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 165-168, 1998.
- LEQUIN, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2416-2418, 2005.
- LI, Y. et al. Development of ELISAs for the detection of vitellogenin in three marine fish from coastal areas of China. **Marine Pollution Bulletin**, n. 133, p. 415-422, 2018.
- LO, Y. M. D. et al. **Clinical Applications of PCR**. New Jersey: Humana Press, 2006.
- LUTHRA, R. et al. **Clinical Applications of PCR**. New York: Humana Press, 2016.
- MA, J. et al. Effects of chlorpyrifos on the transcription of CYP3A cDNA, activity of acetylcholinesterase, and oxidative stress response of goldfish (*Carassius auratus*). **Environmental Toxicology**, 2013.
- MAGYARY, I. Recent advances and future trends in zebrafish bioassays for aquatic ecotoxicology. **Ecocycles**, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2018.
- MARGOSHES, M.; VALLEE, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 4813-4814, 1957.
- MARTÍNEZ-SALES, M. et al. Zebrafish as a possible bioindicator of organic pollutants with effects on reproduction in drinking Waters. **Journal of Environmental Sciences**, 2015.
- MELENDEZ, L. B. et al. Determinação de metalotioneínas e fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 612-622, 2012.
- MEYER, J. N. QPCR: a tool for analysis of mitochondrial and nuclear DNA damage in ecotoxicology. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 804-811, 2010.

MIHAILOVIC, M. et al. Species-specific expression of metallothionein in the hepatopancreas of seawater fish from the Montenegrin Adriatic coastline.

**Studia Marina**, v. 28, n. 1, p. 21-26, 2015.

MILNEROWICZ, H.; BIZÓN, A. Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, n. 1, p. 99–104, 2010.

**Biochimica Polonica**, v. 57, n. 1, p. 99–104, 2010.

MIRACLE, A. L. Environmental Biomarkers. **Encyclopedia of Toxicology**, p. 476-478, 2014.

MIURA, K. et al. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. **Vaccine**, v. 26, p. 193-200, 2008.

MOUNT, D. I. Chronic effect of low pH on fathead minnow survival, growth and reproduction. **Water Research Pergamon Press**, v. 7, p. 987-993, 1973.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. p. 15-38.

NAGAMATSU, P. C. et al. Synthetic fish metallothionein design as a potential tool for monitoring toxic metals in water. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p.9517-9528, 2020.

NANDI, S. et al. Comparative assessment of commercial ELISA kits for detection of HIV in India. **BMC Research Notes**, v.7, n. 436, p. 2-5, 2014.

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION (NASA). When It Comes to Water, You Have to Think Global. NASA Earth Science Division, 2020. Disponível em: <https://www.nasa.gov/feature/when-it-comes-to-water-you-have-to-think-global>. Acesso em: 17 mar. 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological Markers in Environmental Health Research. **Environmental Health Perspectives**, v. 74, p. 3-9, 1987.

NAVARRO-MARTÍN, L. et al. DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts In the European Sea Bass. **PLoS Genet**, v. 7, n. 12, 2011.

NILSEN, B. M. et al. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 621-633, 2004.

NORTON; W.; BALLY-CUIF, L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. **BMC Neuroscience**, v. 11, n. 90, p. 1-11, 2010.

OLIVEIRA, S. R. S. et al. Lesões histopatológicas como biomarcadores de contaminação aquática em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes, Cichlidae) de uma área protegida no Maranhão. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 9, n. 1, p. 12-26, 2016.

PANKHURST, N. W.; HERBERT, N. A. Fish physiology and ecology: the contribution of the Leigh Laboratory to the collision of paradigms. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, 2013.

PANKHURST, N. W.; KING, H. R. Temperature and salmonid reproduction: implications for aquaculture. **Journal of Fish Biology**, n. 76, p. 69-85, 2010.

PECK, K. A. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying vitellogenin in pacific salmon and assessment of field exposure to environmental estrogens. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 477-486, 2011.

PENG, J. et al; Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of ovalbumin in foods. **Food and Agricultural Immunology**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2014.

PERRY, S. et al. **Fish Physiology: Zebrafish**. London: Academic Press, 2010.

PIANA, P. A. et al. Influência da temperature sobre o desenvolvimento de juvenis de piapara (*Leporinus cf. obtusidens*). **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 87-94, 2003.

PIÑA, B. et al. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, 2007.

RAWAT, V. et al. Vitellogenin genes in fish: differential expression on exposure to estradiol. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 39–46, 2013.

READING, B. J. et al. Vitellogenesis in Fishes. In: **Reference Module in Life Sciences**. Elsevier, 2017, p. 1–14.

REDELSTEIN, R.; et al. Bioaccumulation and molecular effects of sediment-bound metals in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 16290-16304, 2015.

REED, B.; JENNINGS, M. Guidance on the housing and care of Zebrafish (*Danio rerio*). 2011.

RICO, E. P. **Influência do metanol e do etanol sobre a atividade e a expressão gênica das ectonucleotidases e acetil colinesterase em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*)**. 114f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

ROCHA, J. S. et al. Variações na demanda de energia metabólica de juvenis

de *Haemulon steindachneri* (Perciformes Haemulidae) em função da temperatura. **Revista Brasileira de Oceanografia**, São Paulo, v.49, n.1-2, p.86-97, 2001.

ROCKS, L.; DAWSON, K. A. The interaction between nanoparticles and biological barriers. **European Journal of Nanomedicine**, v.6, n.3, p.121-122, 2014.

RODRIGUES, I. L. P. **Metalotioneínas como biomarcadores de poluição por metais-traços em corpos d'água utilizando Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) como organismos-teste**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Monitoramento). Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

ROESIJAD, G. Metallothionein and Its Role in Toxic Metal Regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113, n. 2, p.117-123, 1996.

ROSE, S. et al. Immunolocalization of metallothionein in different tissues of fresh water catfish, *Clarias gariepinus* on exposure to cadmium. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 12, p. 5315-5320, 2014.

RUBY, S. M. et al. The effects of depressed pH on oogenesis in flagfish *Jordanella floridae*. **Water Research**, v. 11, p. 757-762, 1977.

SADATI, M. A. Y. et al. Effects of daily temperature fluctuations on growth and hematology of juvenile *Acipenser baerii*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, p. 591-594, 2011.

SAHA, N. et al. Effect of alkalinity (pH 10) on ureogenesis in the air-breathing walking catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, p. 353–364, 2002.

SATO, N. et al. Effects of temperature on vitellogenesis in Japanese eel *Anguilla japonica*. **Fisheries Science**, n. 72, p. 961-966, 2006.

SCHIEFFELIN, J. et al. Clinical validation trial of a diagnostic for Ebola Zaire antigen detection: Design rationale and challenges to implementation. **Clinical Trials**, v. 13, n. 1, p. 66-72, 2016.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Efeitos da temperatura. In: **Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente**. 5.ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 1996 a. p. 217-239.

STEFFEN, G. P. K.; et al. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-lógica**, v. 15, n.1, p. 15-21, 2011.

SEGNER, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 149, p. 187–195, 2009.

SELMAN, K. et al. Stages of Oocyte Development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Journal of morphology**, v. 218, p. 203-224, 1993.

SENAPATI, S. et al. Predicting first trimester pregnancy outcome: derivation of a multiple marker test. **American Society for Reproductive Medicine**, 2016.

SHIMIZU, M. et al. Purification and Identification of a Second Form of Vitellogenin From Ascites of Medaka (*Oryzias latipes*) Treated With Estrogen. **Journal of experimental zoology**, v. 293, p. 726–735, 2002.

SILVA, M. R. F. et al. Biomarkers as a tool to monitor environmental impact on Aquatic Ecosystems. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n. 10, p. 75702-75720, 2020.

SILVERSAND, C. et al. Isolation, Immunochemical Detection, and Observations of the Instability of Vitellogenin From Four Teleosts. **The Journal of experimental zoology**, v. 267, p. 587–597, 1993.

SINAIE, M. et al. Metallothionein biosynthesis as a detoxification mechanism in mercury exposure in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 1235-1242, 2010.

SMALLEY, C. et al. Status of research and development of vaccines for chikungunya. **Vaccine**, 2016.

SNELL, T. W. et al. Gene Expression Profiling in Ecotoxicology. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 475-483, 2003.

SO, Y. P. et al. Plasma vitellogenin in landlocked atlantic salmon (*Salmo salar ouananiche*): isolation, homologous radioimmunoassay\* and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. **Comparative Biochemistry and Phisiology**, v. 81, n. 1, p. 63-71, 1985.

SOUZA, D. B. P. et al. Biomarcadores histológicos em duas espécies de bagres estuarinos da Costa Maranhense, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n.2, p. 369-376, 2013.

STEWART, M. Respiratory mechanisms and the control of breathing. In: **Animal Physiology**. London: The Open University, 1991. p. 199-242.

STRAND, A. et al. Growth and energy expenditures of Eurasian perch *Perca fluviatilis* (Linnaeus) in different temperatures and of different body sizes. **Aquaculture Research and Development**, v. 2, n., 3, p. 2-8, 2011.

- SULLIVAN, C. V.; YILMAZ, S. O. Vitellogenesis and Yolk Proteins, Fish. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 6, p. 266-277, 2018.
- SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 7, p. 173-178, 1995.
- TAKAHASHI, H. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish *Brachydanio rerio*. **Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University**, n. 28, p. 57–65, 1977.
- TAM, W. H. et al. Modification of Carbohydrate Metabolism and Liver Vitellogenic Function in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) by exposure to low pH. **International Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 44, 1987.
- TERATO, K. et al. Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases. **Journal of Immunological Methods**, 2014.
- THIRUMOORTHY, N. et al. Metallothionein: an overview. **World Journal Gastroenterology**, v.13, n. 7, p.993-996, 2007.
- TOM, M. et al. Quantifying fish metallothionein transcript by real time PCR for its utilization as an environmental biomarker. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 7-8, p. 705-710, 2004.
- TYLER, C. R. et al. Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 166, p. 418-426, 1996.
- TYLER, C. R. et al. Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 47–54, 2002.
- UCHIDA, D. et al. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 205, p. 711–718, 2002.
- VALASEK, M. A.; REPA, J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, p. 151-159, 2005.
- VAN CLEEF-TOEDT, K. A. et al. Killifish metallothionein messenger RNA expression following temperature perturbation and cadmium exposure. **Cell Stress & Chaperones** v. 6, n.4, p. 351–359, 2001.
- VASSEUR, P.; COSSU-LEGUILLE, C. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Enviromental International**, v.

28, p. 711-717, 2003.

VERBINNEN, R. T. **Avaliação da atividade estrogênica das águas do rio Itapecuru no município de Bacabeira-MA**. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2014.

VIARENGO, A. et al. Sensitivity and specificity of metallothionein as a biomarker for aquatic environment biomonitoring. In: GARRIGUES, P.; et al. **Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach**. Elsevier Science, 2001.

VORONIN, Y. et al. HIV Vaccine-Induced Sero-Reactivity: A Challenge for Trial Participants, Researchers, and Physicians. **Vaccine**, v. 33, p. 1243-1249, 2015.

WANG, J. et al. Lipovitellin as na antigen to improve the precision of sandwich ELISA for quantifying zebrafish (*Danio rerio*) vitellogenin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, p.87-93, 2016.

WARDLE, C. S. Effects of temperature on the maximum swimming speed of fishes. **Environmental Physiology of Fishes**, 1980.

WOOD, C. M. et al. The physiology of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*) at pH 8.0. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, p. 393-408, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Biomarkers and risk assesment: concepts and principles**. Environmental Health Criteria, 1993.

WRIGHT, P. A. et al. Ammonia and urea excretion in lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) adapted to the highly alkaline pyramid lake (pH 9,4). **Journal of Experimental Biology**, v. 175, p. 153-172, 1993.

WU, S. M. et al. Maternal cadmium exposure induces mt2 and smtB mRNA expression in zebrafish (*Danio rerio*) females and their offspring. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 156, p. 1–6, 2012.

WU, Y. et al. Target-Activated Streptavidin-Biotin Controlled Binding Probe. **Chemical Science**, 2018.

YAMAMOTO, F. Y. et al. Alterations of cytochrome P450 and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguaçu River. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 670-682, 2018.

YAMAMOTO, F. Y. et al. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. **Chemosphere**, 2017.



YU, X. et al. The Effect of Temperature and pH on the Solubility of Quinolone Compounds: Estimation of Heat of Fusion. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 4, 1994.

YUDKOVSKI, Y. et al. Quantitative immunochemical evaluation of fish metallothionein upon exposure to cadmium. **Marine Environmental Research**, v. 65, n. 5, p.427, 2008.

ZHU, Q. et al. Life-cycle exposure to cadmium induced compensatory responses towards oxidative stress in the liver of female zebrafish. **Chemosphere**, v. 210, p. 949-957, 2018.

ZILLER, A.; FRAISSINET-TACHET, L. Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. **The Royal Society of Chemistry**, v.10, p. 1549-1559, 2018.

## APÊNDICE 1 – PROTOCOLO DE ELISA SANDUÍCHE PARA DETECÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM *Danio rerio*

### PROTOCOLO DE ELISA SANDUÍCHE PARA DETECÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM *Danio rerio*

#### - DADOS:

- Anticorpo de captura: anti-MTR (0,17mg/mL).
- Amostras: extrato total de *Danio rerio*.
- Anticorpo de detecção (biotinilado): anti-MT-B (0,22mg/mL).
- Peroxidase conjugada com estreptavidina (SA-HRP) (1mg/mL).
- Metalotioneína recombinante de *Oreochromis niloticus* (190µg/mL).

#### - SOLUÇÕES/MATERIAIS:

- Tampão de sensibilização: carbonato-bicarbonato (50 mM pH 9,6).
- Tampão de bloqueio: BSA 3% em PBS 1x.
- Tampão de lavagem: PBS-T (PBS 1x acrescido de 0,05 % de Tween-20).
- Tampão de diluição: PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA.
- Substrato para peroxidase (TMB).
- Solução de parada de reação: Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M).
- Placas de poliestireno de alta ligação com 96 poços (*Nunc<sup>TM</sup> - Thermo Fisher Scientific*).
- Reservatórios para soluções com capacidade de 50 mL autoclavados.
- Micropipetas monocanaís (p10, p20, p200 e p1000) e micropipeta multicanal (p200), e ponteiras.
- Papel toalha de alta absorção.
- Timer e termômetro.

#### - PROCEDIMENTOS:

- ETAPA 1: Sensibilização das placas (*coating* ou imobilização dos anticorpos de captura)
  1. Diluir anticorpo de captura para a concentração de 0,5µg/mL no tampão de sensibilização.
  2. Adicionar 100µL da solução por poço da microplaca de poliestireno.

3. Selar a placa e incubar a placa por 20 horas a 4°C.
  4. Lavar os poços 2 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
- ETAPA 2: Bloqueio
    1. Adicionar 150 µL por poço do tampão de bloqueio.
    2. Selar a placa e incubar por 2h em temperatura ambiente; enquanto isso preparar as diluições das amostras para a próxima etapa, mantendo-as no gelo.
    3. Lavar os poços 3 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
  - ETAPA 3: Captura da proteína-alvo ou analito
    1. Centrifugar as amostras, em 3000rpm, por 10min, à 4°C, para remover agregados.
    2. Diluir as amostras de *D. rerio* em 20x, em tampão diluente; preparar a curva com tampão diluente e metalotioneína recombinante.
    3. Inserir 100µL de solução (curva e amostras) em seus respectivos poços.
    4. Selar a placa e incubar à 37°C por 60min; enquanto isso, fazer a diluição do anticorpo biotinilado.
    5. Lavar os poços 4 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
  - ETAPA 4: Detecção
    1. Diluir o anticorpo biotinilado para 2,5 µg/mL em tampão diluente.
    2. Adicionar 100µL da solução contendo o anticorpo biotinilado por poço.
    3. Selar a placa e incubar a placa por 60min à 37°C; enquanto isso, fazer a diluição do SA-HRP, mantendo a solução no gelo.
    4. Lavar os poços 4 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
    5. Diluir SA-HRP para 1:30000 em tampão diluente; adicionar 100µL por poço.
    6. Selar a placa e incubar por 60min, em temperatura ambiente.
    7. Lavar os poços 4 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
    8. Revelação da reação: acrescentar 100µL por poço do substrato TMB (que deve estar em temperatura ambiente).

9. Incubar por 30min em temperatura ambiente e ausência de luz.
10. Parada da reação: adicionar 50 $\mu$ L por poço da solução de parada; incubar por 10 minutos, em ausência de luz.
11. Ler a absorbância em 450nm, em até 30 minutos após parar a reação.

## APÊNDICE 2 – PROTOCOLO DE ELISA SANDUÍCHE PARA DETECÇÃO DE VITELOGENINA EM *Danio rerio*

### PROTOCOLO DE ELISA SANDUÍCHE PARA DETECÇÃO DE METALOTIONEÍNA EM *Danio rerio*

#### - DADOS:

- Anticorpo de captura: anti-VTGR (1,4mg/mL).
- Amostras: extrato total de *Danio rerio*.
- Anticorpo de detecção (biotinilado): anti-VTGR-B (0,74 mg/mL).
- Peroxidase conjugada com estreptavidina (SA-HRP) (1mg/mL).
- Vitelogenina purificada por cromatografia (480µg/mL).

#### - SOLUÇÕES/MATERIAIS:

- Tampão de sensibilização: carbonato-bicarbonato (50 mM pH 9,6).
- Tampão de bloqueio: BSA 3% em PBS 1x.
- Tampão de lavagem: PBS-T (PBS 1x acrescido de 0,05 % de Tween-20).
- Tampão de diluição: PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA.
- Substrato para peroxidase (TMB).
- Solução de parada de reação: Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M).
- Placas de poliestireno de alta ligação com 96 poços (*Nunc<sup>TM</sup> - Thermo Fisher Scientific*).
- Reservatórios para soluções com capacidade de 50 mL autoclavados.
- Micropipetas monocanaís (p10, p20, p200 e p1000) e micropipeta multicanal (p200), e ponteiras.
- Papel toalha de alta absorção.
- Timer e termômetro.

#### - PROCEDIMENTOS:

- ETAPA 1: Sensibilização das placas (*coating* ou imobilização dos anticorpos de captura)
  1. Diluir anticorpo de captura para a concentração de 0,2µg/mL no tampão de sensibilização.
  2. Adicionar 100µL da solução por poço da microplaca de poliestireno.

3. Selar a placa e incubar a placa por 17 horas a 4°C.
  4. Lavar os poços 2 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
- ETAPA 2: Bloqueio
    1. Adicionar 150 µL por poço do tampão de bloqueio.
    2. Selar a placa e incubar por 1:30h em temperatura ambiente; enquanto isso preparar as diluições das amostras para a próxima etapa, mantendo-as no gelo.
    3. Lavar os poços 3 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
  - ETAPA 3: Captura da proteína-alvo ou analito
    1. Centrifugar as amostras, em 3000rpm, por 10min, à 4°C, para remover agregados.
    2. Diluir as amostras de *D. rerio* 1:1 vezes em tampão diluente; preparar a curva com tampão diluente e vitelogenina purificada.
    3. Inserir 100µL de solução (curva e amostras) em seus respectivos poços.
    4. Selar a placa e incubar à 37°C por 60min; enquanto isso, fazer a diluição do anticorpo biotinilado.
    5. Lavar os poços 3 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
  - ETAPA 4: Detecção
    1. Diluir o anticorpo biotinilado para 1 µg/mL em tampão diluente.
    2. Adicionar 100µL da solução contendo o anticorpo biotinilado por poço.
    3. Selar a placa e incubar a placa por 60min à 37°C; enquanto isso, fazer a diluição do SA-HRP, mantendo a solução no gelo.
    4. Lavar os poços 4 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
    5. Diluir SA-HRP para 1:10000 em tampão diluente; adicionar 100µL por poço.
    6. Selar a placa e incubar por 60min, em temperatura ambiente.
    7. Lavar os poços 4 vezes, 1min cada vez, com 150µL do tampão de lavagem.
    8. Revelação da reação: acrescentar 100µL por poço do substrato TMB (que deve estar em temperatura ambiente).

9. Incubar por 20min em temperatura ambiente e ausência de luz.
10. Parada da reação: adicionar 50 $\mu$ L por poço da solução de parada; incubar por 10 minutos, em ausência de luz.
11. Ler a absorbância em 450nm, em até 30 minutos após parar a reação.

### APÊNDICE 3 – PROTOCOLO DE OTIMIZAÇÃO DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

#### PROTOCOLO DE OTIMIZAÇÃO DE TEMPERATURA DE ANELAMENTO DE *PRIMERS*

##### - PROCEDIMENTOS

- ETAPA 1: diluir os *primers* para 2 $\mu$ M.
- ETAPA 2: diluir as amostras teste para 50ng/ $\mu$ L.
- ETAPA 3: identificar os microtubos de acordo com o gene de interesse e a temperatura testada.
- ETAPA 4: nos microtubos de PCR, adicionar (nesta ordem; soma-se um total de 20  $\mu$ L em cada microtubo):
  - \* 1º: 2  $\mu$ L de cDNA.
  - \* 2º: 6,6 de Mix para PCR (contendo taq DNA polimerase e dNTPs).
  - \* 3º: 2  $\mu$ L de *primer forward* (f).
  - \* 4º: 2  $\mu$ L de *primer reverse* (r).
  - \* 5º: 7,4  $\mu$ L de água ultrapura autoclavada.
- ETAPA 5: no termociclador convencional, sob programação: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, temperaturas de anelamento testadas (58, 60 e 62°C) por 15 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos; seguido de 72°C por 5 minutos. Colocar os microtubos de PCR no termociclador, de acordo com a temperatura de cada fileira.
- ETAPA 6: para preparar o gel de agarose (1,8%; pesar 0,54g de agarose em papel manteiga; colocar a agarose em 30mL de TAE 1X em um Erlenmeyer e levar a mistura ao microondas, mexendo de 30s em 30s até ficar bem homogêneo e transparente; montar a cuba; transferir para outro Erlenmeyer e adicionar 2  $\mu$ L de brometo de etídeo; após homogeneizar bem, colocar na cuba com os pentes e aguardar polimerização em temperatura ambiente).
- ETAPA 7: após o tempo necessário no termociclador, corar as amostras e o marcador/leader com corante (4  $\mu$ L de corante azul e 20  $\mu$ L de amostra; 3  $\mu$ L de tampão azul e 5  $\mu$ L de leader).



- ETAPA 8: transferir o gel para a cuba de corrida após polimerização, e cobri-lo com TAE 1X; pipetar 20  $\mu$ L das amostras coradas nos seus respectivos poços do gel; correr o gel por 35min, a 70V.
- ETAPA 9: ler o gel em aparelho fotodocumentador, sob luz UV.

## APÊNDICE 4 – PROTOCOLO DE rt-qPCR

### PROTOCOLO DE rt-qPCR

#### - PROCEDIMENTOS

- ETAPA 1: diluir os *primers* para 2 $\mu$ M.
- ETAPA 2: diluir a amostras para 50ng/ $\mu$ L.
- ETAPA 3: preparar os mix de cada *primer*/gene, pipetando:
  - \*\*\* H1, H2 e G2:
    - \* 1º: 10  $\mu$ l de *Mix SYBRGreen* (concentração final de 1x).
    - \* 2º: 2  $\mu$ l de *primer forward* (2  $\mu$ M; concentração final de 0,2  $\mu$ M).
    - \* 3º: 2  $\mu$ l de *primer reverse* (2  $\mu$ M; concentração final de 0,2  $\mu$ M).
    - \* 5º: 4  $\mu$ l de água ultrapura autoclavada.
  - \*\*\* G1:
    - \* 1º: 10  $\mu$ l de *Mix SYBRGreen* (concentração final de 1x).
    - \* 2º: 4  $\mu$ l de *primer forward* (2  $\mu$ M; concentração final de 0,4  $\mu$ M).
    - \* 3º: 4  $\mu$ l de *primer reverse* (2  $\mu$ M; concentração final de 0,4  $\mu$ M).
- ETAPA 4: preparar as diluições da curva de cDNA (controle positivo) para 100 e 50ng/ $\mu$ L (fator de diluição 1:2).
- ETAPA 5: preparar o controle negativo, para triplicata (40 $\mu$ L de *Mix SYBRGreen*, 8 $\mu$ L de *primer forward*, 8 $\mu$ L de *primer reverse*, 24 $\mu$ L de água).
- ETAPA 6: Pipetar 18 $\mu$ L de mix por poço da placa de PCR, em triplicata, de acordo com o mapa; pipetar 20 $\mu$ L do mix de controle negativo por poço da placa, de acordo com o mapa da placa; pipetar 2 $\mu$ L (concentração final de 100ng) de cDNA por poço da placa de PCR, em triplicata, de acordo com o mapa.
- Pipetar a curva (controle positivo) e o controle negativo na placa, de acordo com o mapa.
- ETAPA 7: no termociclador de rt-qPCR, após ligar o equipamento e colocar a placa corretamente no equipamento, selecionar “New Experiment”:
  - \*\*\* Experiment properties: nomear o experimento (“Experiment Name”); selecionar “StepOnePlus™ Instrument (96 Wells)” e “Quantitation”.

\*\*\* Methods and Materials: selecionar “Standard Curve”, “SYBR® Green Reagents”, “Standard (~2 hours to complete a run)” e “cDNA (complementary DNA).

\*\*\* Targets: em “How many targets do you want to quantify in the reaction plate?”, manter 1.

\*\*\* Standards: em “Set up standards” selecionar 5 pontos da curva, 3 replicatas e fator de diluição 1:2.

\*\*\* Samples: selecionar 1 amostra, 3 replicatas, 0 controle negativo.

\*\*\* Run Method: selecionar o primeiro step, clicar em “Add step > Before”; ajustar para 50°C a 2min e 95°C a 2min (1 ciclo), 95°C a 15seg e 60°C a 1min (40 ciclos), e 95°C a 15seg, 60°C a 1min e 95°C a 15seg (1 ciclo).

\*\*\* Reaction Setup: selecionar 20uL por poço; selecionar “Finish Designing Experiment > Edit Plate Layout”.

\* em “Define Targets and Samples > Define Targets”, selecione “Add New Target” para adicionar todos os *primers* que estão sob avaliação; renomeie os targets de acordo com o código que você utiliza, e verifique se o “reporter” está como “SYBR”, e o “quencher” está como “none”.

\* em “Assign Targets and Samples > Define and Set Up Standards”, selecione o gene em “Select a target”; em “Define the standard curve”, selecione 5 pontos, 3 réplicas, 100 como “starting quantity”, e fator serial de 1:2; em “Select and arrange wells for the standards”, selecione “Let Me Select Wells”, e selecione os poços da placa desenhada que correspondem ao gene selecionado; selecione “Apply > yes”; faça o mesmo para cada gene que está sob avaliação; selecione “Close” e verifique se o desenho da placa está como o desejado; para apagar desenhos automáticos indesejados, basta selecionar os poços da placa virtual e deselegionar o target em “Assign targets to the selected wells”.

\*\*\* Verifique se tudo está correto em “Experiment properties”, “Plate Setup”, “Run Method”, “Reaction Setup” e “Materials List”; selecione “Run > Start Run”.

## ANEXO 1 – APROVAÇÃO E REGISTRO DOS PROCEDIMENTOS PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFPR



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1280

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.075523/2018-79

**APROVADO/APPROVAL:** 18/06/2019 – R.O. 05/2019

**TÍTULO:** Avaliação da interferência de parâmetros físicos e químicos na expressão de metalotioneína e vitelogenina em zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822).

**TITLE:** Evaluation of the interference of physical and chemical parameters in the expression of metalotionein and vitelogenin in zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822).

**AUTORES/AUTHORS:** Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Roberta Pozzan.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
**Coordenadora da CEUA**



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 30/07/2019, às 01:12, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAICO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/11/2019, às 09:33, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **1986018** e o código CRC **FC400179**.